Aus dem Institut für Virologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof.Dr. Hanns Ludwig

Charakterisierung gemeinsamer Epitope auf Hüllantigenen bei Pseudorabies-Virus, bovinem Herpesmammillitis-Virus und Herpes simplex-Virus mit Hilfe monoklonaler Antikörper

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
DOKTORS DER VETERINÄRMEDIZIN

vorgelegt von
FRANZ JOSEF CONRATHS
Tierarzt aus Wevelinghoven

Berlin 1986
Journal-Nr. 1286

Aus dem Institut für Virologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. Hanns Ludwig

Charakterisierung gemeinsamer Epitope auf Hüllantigenen bei Pseudorabies-Virus, bovinem Herpesmammillitis-Virus und Herpes simplex-Virus mit Hilfe monoklonaler Antikörper

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
DOKTORS DER VETERINÄRMEDIZIN

vorgelegt von
FRANZ JOSEF CONRATHS
Tierarzt aus Wevelinghoven

Berlin 1986
Journal-Nr. 1286

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin.

Fachbereichssprecher:	Prof. Dr. F. Hörchner
Erster Gutachter:	Prof. Dr. H. Ludwig
Zweiter Gutachter:	Priv.-Doz. Dr.-Ing. E. Reinwald

Tag der Promotion: 22. Oktober 1986

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	9
2	LITERATURÜBERSICHT	11
2.1	Geschichte	11
2.2	Morphologische Eigenschaften der Herpesviren	14
2.3	Charakteristika der glykosilierten Polypeptide von Herpesviren	15
2.3.1	Struktur	16
2.3.2	Synthese und Reifung	17
2.3.3	Funktion	19
3	PROBLEMSTELLUNG	22
4	MATERIAL UND METHODEN	23
4.1	Viren	23
4.2	Zellkulturen	24
4.3	Virusvermehrung in der Zellkultur	26
4.3.1	Infektion der Zellkulturen	26
4.3.2	Virusernte	26
4.3.3	Gewinnung radioaktiv markierter, viruskodierter Glykoproteine	27
4.4	Plaquetest	27
4.5	Virusreinigung	29
4.6	Antiseren	30
4.7	Herstellung monoklonaler Antikörper	31
4.7.1	Zellysate zum Immunisieren	31
4.7.2	Immunisierung von Balb/c-Mäusen	32
4.7.3	Herstellung von Hybridoma-Kulturen	33
4.7.4	Kultivierung von Antikörper-produzierenden Hybridoma-Zellen	38
4.7.5	Gewinnung von Aszites-Flüssigkeiten	42

		Seite
4.8	Herkunft der monoklonalen Antikörper	43
4.9	Reinigung monoklonaler Antikörper	43
4.9.1	Konzentrieren von Überständen	43
4.9.2	Reinigung monoklonaler Antikörper durch Affinitäts-Chromatographie	44
4.9.3	Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)	48
4.9.4	Biotin-Markierung monoklonaler Antikörper nach GODING (1983)	51
4.10	Methoden zur Charakterisierung monoklonaler Antikörper	52
4.10.2	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	52
4.10.3	Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)	55
4.10.4	Neutralisationstest	56
4.10.5	Test auf Penetrationshemmung	59
4.10.6	Test auf Fusionshemmung	59
4.10.7	Indirekte Immunpräzipitation	59
4.10.8	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	63
4.10.9	Immunoblot	69
4.10.10	Immunelektronenmikroskopie	73
5	ERGEBNISSE	74
5.1	Charakterisierung monoklonaler Antikörper	74
5.1.1	Monoklonale Antikörper gegen SHV-1	74
5.1.2	Proteine des BHV-2	80
5.1.3	Charakterisierung BHV-2-spezifischer monoklonaler Antikörper	85
5.1.4	Eigenschaften der gegen Antigene von HSV gerichteten monoklonalen Antikörper	97
5.2	Kreuzreaktionen	99
5.2.1	ELISA und IFT	100
5.2.2	Kreuzneutralisation	101
5.2.3	Untersuchungen im Immunoblot	103
5.2.4	Immunpräzipitationen	104
5.2.5	Lokalisierung kreuzreagierender Antigene in infizierten Zellen	110
5.2.6	Zeitliches Auftreten der kreuzreagierenden Antigene in BHV-2- und HSV-1-infizierten Zellen	118

		Seite
5.2.7	Immunelektronenmikroskopie	119
6	DISKUSSION	125
6.1	Monoklonale Antikörper gegen SHV-1	125
6.2	Virusstrukturproteine und hauptimmunogene Komponenten des BHV-2	127
6.3	Monoklonale Antikörper gegen BHV-2	127
6.4	Monoklonale Antikörper gegen HSV	134
7	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	136
8	LITERATURVERZEICHNIS	138
	Lebenslauf	166

Meiner Frau Kornelia
und meinen Eltern gewidmet

Abkürzungen

Aqua dest.	destilliertes Wasser (*Aqua destillata*)
B Virus	*Herpesvirus simiae*
BHV-1	Bovines Herpesvirus Typ 1
BHV-2	Bovines Herpesvirus Typ 2
BHV-6	Bovines Herpesvirus Typ 6
CMC	Carboxymethylcellulose
CN	Cellulosenitrat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Natrium-Desoxycholat
EDM	Eagle's minimum essential medium, Dulbecco's modification
EHV-1	Equines Herpesvirus Typ 1
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FPLC	Fast protein liquid chromatography
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HSV-1	Herpes simplex Virus Typ 1
HSV-2	Herpes simplex Virus Typ 2
IFT	Immunfluoreszenztest
m.o.i.	Infektionsmultiplizität, (multiplicity of infection)
NCS	Serum neugeborener Kälber, (newborn calf serum)
NP-40	Nonidet P-40
n.t.	nicht getestet
O.D.	Extinktion, (optical density)
PBE	plaquebildende Einheit
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, (phosphate buffered saline)
PEG	Polyethylenglykol
p.i.	nach der Infektion *(post infectionem)*
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SHV-1	Suid Herpesvirus Typ 1 (Pseudorabiesvirus)
Tab.	Tabelle
TK	Thymidinkinase
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen (weight/volume)

1 EINLEITUNG

Trotz ihrer einheitlichen Morphologie lassen sich Herpesviren serologisch differenzieren (WILDY *et al.*, 1960). Dies beruht vor allem auf den Antigeneigenschaften der Virushülle. Lediglich zwei Polypeptide aus der Gesamtzahl der Virusstrukturproteine scheinen regelmäßig eine Verwandtschaft aufzuweisen. Dabei handelt es sich einmal um das Haupt-Kapsidprotein, das mit Molekulargewichten von 140 - 160 K bei Suid Herpesvirus Typ 1 (Pseudorabies Virus, SHV-1), Equinem Herpesvirus Typ 1 (Rhinopneumonitis Virus, EHV-1), Herpes simplex Virus Typen 1 und 2 (HSV-1, HSV-2) und Bovinem Herpesvirus Typ 2 (bovines Herpesmammillitis Virus, BHV-2) sowohl eine vergleichbare Größe besitzt, als auch im Hinblick auf gemeinsame Epitope eine ähnliche Struktur aufweist (KILLINGTON *et al.*, 1977; YEO *et al.*, 1980). Untersuchungen an Kapsiden von BHV-1 und dem Bovinen Herpesvirus Typ 6 (Ziegenherpesvirus, BHV-6) ergaben, daß bei diesen Viren ebenfalls kreuzreagierende Determinanten vorliegen (GREGERSEN, 1983). YEO und Mitarbeiter (1980) fanden, daß zum zweiten die Analoga des von PURIFOY und POWELL (1976) beschriebenen "major DNA binding protein" bei HSV-1, BHV-2, EHV-1 und SHV-1 gruppenspezifische Epitope tragen.

Seltener stößt man auf Kreuzreaktionen zwischen Virushüllproteinen. Solche Antigenverwandtschaften, vor allem mit Hilfe des Neutralisationstestes spezifiziert, wurden bei HSV-1 und -2 (SCHNEWEIS u. BRANDIS, 1961; SCHNEWEIS u. NAHMIAS, 1971; ROIZMAN *et al.*, 1973), HSV und BHV-2 (STERZ, 1973; STERZ *et al.*, 1973-1974; KILLINGTON *et al.*, 1977), HSV und B Virus (LUDWIG *et al.*, 1978), HSV, BHV-2 und EHV-1 (SNOWDEN *et al.*, 1984) HSV, B Virus, SA8 Virus und BHV-2 (KILLINGTON *et al.*, 1977), HSV-1 und *Herpesvirus tamarinus* (BLUE u. PLUMMER, 1973) sowie Bovinem Herpesvirus Typ1 (Infektiöse Bovine Rhinotracheitis/Infektiöse Pustulöse Vulvovaginitis, BHV-1) und BHV-6 (ENGELS *et al.*, 1983; GREGERSEN, 1983) beschrieben.

Soweit HSV in die Verwandtschaft einbezogen ist, scheint dessen Glykoprotein gB eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der Kreuzreaktion zu spielen (zur Übersicht siehe: LUDWIG, 1983; LUDWIG et al., 1983).

Das Vorhandensein gemeinsamer Antigendeterminanten wirft die Frage auf, ob die kreuzreagierenden Polypeptide gleiche oder ähnliche biologische Funktionen in den verschiedenen Virussystemen besitzen. Hinsichtlich der Eigenschaft, kreuzreagierende neutralisierende Antikörper zu induzieren, kann diese Frage zumindest für HSV-1, HSV-2, BHV-2, B Virus und SA8 Virus sowie für BHV-1 und BHV-6, teils im Sinne von Ein-Weg-Kreuzreaktionen, bejaht werden. Bevor jedoch weitere Funktionen der viralen Glykoproteine verglichen werden können, bedarf es ihrer grundsätzlichen Strukturaufklärung und der Funktionsanalyse im homologen System.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an tier- und humanmedizinisch wichtigen Herpesviren Grundlagenarbeit über Hüllproteine zu leisten, mit Hilfe monoklonaler Antikörper in der Evolution konservierte Epitope zu lokalisieren und die Funktionen der entsprechenden Domänen zu analysieren.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Geschichte

Erste Hinweise auf eine Verwandtschaft von HSV, SHV-1 und dem B Virus erhielten bereits SABIN (1934) sowie BURNET und Mitarbeiter (1939). SABIN fiel der ähnliche, teils nicht unterscheidbare Krankheitsverlauf der drei Herpesvirus-Infektionen nach autologer intracutaner Inokulation infizierter Kaninchenhoden auf. Hohe Prozentsätze der infizierten Tiere entwickelten Enzephalitiden (HSV) beziehungsweise aufsteigende Myelitiden (B Virus, SHV-1), die zum Tode führten. Bei der histologischen Untersuchung infizierter Gewebe konnten regelmäßig azidophile intranukleäre Einschlußkörperchen beobachtet werden. Durch Neutralisationsexperimente in Kaninchen und Rhesusaffen wurde festgestellt, daß Rekonvaleszenten- und Hyperimmunseren von SHV-1- oder B Virus-infizierten Rhesusaffen, Kaninchen oder Meerschweinchen HSV bzw. B Virus bis zu einem gewissen Grade kreuzneutralisierten. BURNET *et al.* (1939) bestätigten diese Befunde durch Neutralisationstests auf der Chorioallantoismembran von Hühnerembryonen. Auch WATSON *et al.* (1967) konnten zeigen, daß B Virus von einem gegen HSV gerichteten Serum inaktiviert wurde, während Pseudorabiesvirus in ihren Händen an der Kreuzneutralisation nicht beteiligt war, wohl aber im Agargelpräzipitationstest mindestens ein verwandtes Antigen aufwies. Wenn *in vitro* auch niemals Kreuzneutralisation von SHV-1 mit einem anderen Herpesvirus gefunden wurde, so scheint dieses Virus doch ebenfalls Antigenverwandtschaft zu anderen Vertretern der Herpesviren aufzuweisen (SHARMA *et al.*, 1972). Die Kreuzreaktion zwischen HSV und SHV-1 erstreckt sich auf wenigstens ein Hüllprotein (SNOWDEN *et al.*, 1984).

Die Existenz von mindestens zwei verschiedenen Viren, die an der Herpes simplex Infektion des Menschen beteiligt sein sollten, wurde bereits von LIPSCHÜTZ (1921) postuliert. Bis in die 50iger Jahre gab es jedoch keine geeigneten klinischen oder virologischen Kriterien für eine solche Unterteilung. Erst serologische Untersuchungen bewiesen die Existenz von zwei Typen des HSV (SCHNEWEIS und BRANDIS, 1961). Als SCHNEWEIS (1967) diese Daten zu den klinischen Befunden in Beziehung setzte, stellte er fest, daß aus Herpesläsionen an Mund, Rachen, Gesicht und Auge stets nur HSV-1 isoliert wurde, während bei Infektionen der Genitalregion und der Extremitäten HSV-2 überwog. In Gehirnen von Patienten, die an Herpesenzephalitis gestorben waren, fand er in fast allen Fällen den Typ 1. Es gelang ihm darüber hinaus, mit serologischen Methoden die Verwandtschaft von HSV und B Virus näher zu charakterisieren (SCHNEWEIS, 1962).

Die serologische Unterscheidung von HSV-1 und -2 wurde durch DNA-Analysen der Viren endgültig bestätigt (KIEFF *et al.*, 1971; KIEFF *et al.*, 1972; LUDWIG *et al.*, 1972). Weitere Untersuchungen an den Genomen dieser Viren zeigten eine ca. 50 % DNA-Homologie der HSV-Typen untereinander und 5 - 15 % Verwandtschaft mit der DNA anderer Herpesviren auf (LUDWIG, 1972). Die HSV-1- bzw. -2-kodierten Polypeptide wurden verglichen (SPEAR u. ROIZMAN, 1972; HEINE *et al.*, 1974; CASSAI *et al.*, 1975; PEREIRA *et al.*, 1976; POWELL *et al.*, 1977; MORSE *et al.*, 1978) und die Grenzen der Verwandtschaft ihrer Antigene zu denen anderer animaler Viren abgesteckt (HONESS und WATSON, 1977).

Von den mehr als 50 viralen Proteinen, die während eines Vermehrungszyklus von HSV synthetisiert werden, tragen jeweils mindestens sechs bei HSV-1 und -2 Saccharid-Seitenketten. Gemäß internationalen Übereinkünften zur Nomenklatur der Glykoproteine von Herpesviren werden stabile glykosylierte Polypeptide mit einem kleingeschriebenen "g" und einem Großbuchstaben bezeichnet. Später legte man darüber hinaus fest, daß Vorläufermoleküle zusätzlich den Prefix "p" (precursor) erhalten sollten und durch Anhängen von "-1" oder "-2" an die Großbuchstaben zwischen den Glykoproteinen von HSV-1

und -2 unterschieden werden kann.

Von menschlichen HSV-Rekonvaleszentenseren und Cerebrospinalflüssigkeiten werden am stärksten die mit gB-1, gC-1 bzw. gD-1 bezeichneten Glykoproteine erkannt (PAULI u. LUDWIG 1977; NORRILD *et al.*, 1978 a, NORRILD, 1984; SPEAR, 1985). Über gB, gC und gD hinaus existieren bei HSV-1 die Glykoproteine gE und gH (SPEAR, 1976; SHOWALTER *et al.*, 1981; BUCKMASTER *et al.*, 1984).

Alle bislang bei HSV-1 bekannten Glykoproteine mit Ausnahme von gG-2 verfügen über ein immunologisch kreuzreagierendes Polypeptid bei HSV-2. Bis vor kurzem wurde sogar allgemein davon ausgegangen, daß ein Gegenstück zu gG-2 bei HSV-1 nicht existiert. Jedoch fanden ACKERMANN und Mitarbeiter (1986) inzwischen ein HSV-1-spezifisches Glykoprotein, das sie als gG-1 definieren konnten. Für alle Glykoproteine von HSV-1 und -2 gilt mit Ausnahme von gG-2, daß sie sowohl typspezifische als auch gemeinsame Epitope tragen (NORRILD, 1984).

Das zunächst gA benannte Protein (SPEAR, 1976) stellt einen Vorläufer des gB dar (EBERLE und COURTNEY, 1980; PEREIRA *et al.*, 1981; BALACHANDRAN *et al.*, 1982) und heißt deshalb heute "pgB". Das ursprünglich als gF-2 bezeichnete Polypeptid erwies sich später als Analogon zu gC-1 und wurde deshalb in gC-2 umbenannt.

Wie aus den im Laufe der Jahre notwendigen Umbenennungen der HSV-Glykoproteine ersichtlich, bleibt das Zusammenspiel von Vorläuferproteinen und reifen Polypeptiden immer noch außerordentlich komplex. Die Bestimmung der korrespondierenden kreuzreagierenden Proteine gelang erst mit der Entwicklung hochspezifischer Seren und letztlich durch monoklonale Antikörper.

Die Antigenverwandtschaft von HSV und dem bovinen Herpesmammillitisvirus wurde von STERZ (1973) entdeckt. Er fand, daß BHV-2 von menschlichen Seren mit Antikörpern gegen HSV neutralisiert wurde. Andererseits wurde festgestellt, daß ein gegen HSV gerichtetes Kaninchen-Hyperimmunserum wenig oder überhaupt nicht an BHV-2-infizierte Zellen band und dieses Virus

selbst in Gegenwart von Komplement kaum inaktivierte, während ein analog gewonnenes Serum gegen BHV-2 in beiden Tests mit HSV sehr viel deutlicher kreuzreagierte (PAULI *et al.*, 1979; LUDWIG, 1983). Mehrere Berichte belegen, daß die Immunisierung mit BHV-2 Mäuse vor letalen HSV-1 oder -2 induzierten Enzephalitiden zu schützen vermag (STERZ *et al.*, 1973-74; LUDWIG, 1976; LUDWIG *et al.*, 1978).

Weitere Untersuchungen der verwandten Hüllantigene von HSV und BHV-2 ergaben, daß bei HSV hauptsächlich das Glykoprotein gB an der Kreuzreaktion beteiligt ist. Als sein Gegenüber bei BHV-2 erwies sich ein Glykoprotein mit dem relativen Molekulargewicht von 125 K (LUDWIG *et al.*, 1978).

2.2 Morphologische Eigenschaften

Die Herpesviren besitzen als Genom eine doppelsträngige, lineare Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid, DNA), die sich im elektronenopaken, torusförmigen Kern ("core") des Virions befindet. Um das Core mit einem Durchmesser von 25 nm (FURLONG *et al.*, 1972) werden Herpesvirus-Kapside im Kern der infizierten Zelle zusammengesetzt. Je 162 Kapsomeren bilden dabei einen Ikosaeder mit etwa 100 nm Durchmesser. Die einzelnen Kapsomeren erscheinen als hexagonale bzw. am Vertex pentagonale, hohle Prismen mit einem axialen Hohlraum von ca. 4 nm. Für die Hexamere wurden Längenabmessungen von 9,5 x 12,5 nm beschrieben (WILDY u. WATSON, 1963). Reife Viruspartikel tragen eine Lipoproteinhülle ("envelope"), die als Derivat der Kernmembran angesehen wird und einen trilaminären Aufbau zeigt. Mitsamt dem Envelope mißt ein Herpesvirus 150 - 170 nm im Durchmesser. Aus der Hülle heraus ragen zahlreiche, mit 8 nm im Vergleich zu anderen Viren relativ kurze Protrusionen ("spikes") (WILDY u. WATSON, 1963). Der Raum zwischen Kapsid und Hülle wird vom Tegument ausgefüllt, über dessen Struktur und Funktion wenig bekannt ist (ROIZMAN u. FURLONG, 1974).

Während ihm in Dünnschnitten keine definierte Struktur zuzuordnen ist, soll es bei der Negativ-Kontrastierung als faserige Zone erscheinen. Das Tegument ist häufig asymmetrisch zwischen Kapsid und Hülle verteilt (ROIZMAN u. BATTERSON, 1985).

2.3 Charakteristika glykosylierter Polypeptide der Herpesviren

Den viralen Glykoproteinen, die sowohl in der Virushülle als auch in der infizierten Zelle vorgefunden werden, lassen sich wichtige Funktionen im Zusammenhang mit der Pathogenese viraler Erkrankungen zuordnen. Sie vermitteln Adsorption und Penetration, beeinflussen den Tropismus ebenso wie das Wirtszellspektrum und werden bei Synzytien induzierenden Viren für die Fusion der Zellen verantwortlich gemacht. Außerdem gelten sie als wichtige Induktoren einer schützenden Immunantwort.

Bei den Herpesviren liegen zur Zeit über die Glykoproteine von HSV die detailliertesten Erkenntnisse vor, so daß es sich anbietet, ihre bisher bekannten Eigenschaften exemplarisch für andere animale Herpesviren darzustellen.

Intertypische Rekombination zwischen HSV-1 und -2 in Verbindung mit anschließender Kartierung verschiedener Genloci legen den Schluß nahe, daß die Genome von HSV-1 und -2 größtenteils, wenn nicht vollständig kolinear sind (MORSE *et al.*, 1977; PRESTON *et al.*, 1978). Die Genorte der Hauptglykoproteine von HSV-1 und -2 sind bekannt (SPEAR, 1985). Die für gB, gC und gD kodierenden Regionen wurden sequenziert und die Aminosäuresequenzen der Polypeptide vorhergesagt (WATSON *et al.*, 1982; FRINK *et al.*, 1983; BZIK *et al.*, 1984).

2.3.1 Struktur

Den Glykoproteinen gB, gC und gD ist der gleiche Grundaufbau zu eigen, den auch viele andere Membranproteine zeigen. Am aminoterminalen Ende befindet sich eine 15-30 Aminosäuren lange Signal- oder "Leader"sequenz mit einer hydrophoben Kernregion von mindestens 9 Aminosäuren und einem geladenen Rest (Arginin) in unmittelbare Nähe des N-Terminus (KREIL, 1981). Bei gB fällt eine ungewöhnlich lange Signalsequenz auf (SPEAR, 1985). EISENBERG *et al.* (1984) beschrieben, daß die Leadersequenz von gD posttranslational abgespalten wird. Ob ein Entfernen der Signalpeptidkette bei der Reifung von gB und gC ebenfalls stattfindet, ist bisher nicht geklärt. Generell vermutet man, daß die Leadersequenzen für die Insertion entstehender Peptide an die Membranen des endoplasmatischen Retikulum notwendig sind und den gerichteten Transport der wachsenden Polypeptidkette durch die Membran ermöglichen (BLOBEL *et al.*, 1979; KREIL, 1981)

Die an diese Sequenz anschließende Region trägt die zur Glykosylierung vorgesehenen Aminosäuren. Neben der N-glykosidischen Bindung von Oligosacchariden an Asparaginreste (MARSHALL, 1974) wurden speziell bei gC auch O-glykosidisch gebundene Kohlenhydrate gefunden (OLOFSON *et al.*, 1981, OLOFSON *et al.*, 1983, JOHNSON u. SPEAR, 1983, WENSKE u. COURTNEY, 1983). Wie sich aus den vorhergesagten Aminosäuresequenzen ergibt, weisen die Glykoproteine gB und gC jeweils neun potentielle Glykosylierungsstellen für N-glykosidische Bindungen auf, während gD nur über drei verfügt. Welche der Bindungsstellen bei gB und gC tatsächlich benutzt werden, ist ungeklärt. Der die Oligosaccharidketten tragende Teil des Glykoproteins beinhaltet die mehr oder weniger hydrophilen Domänen des Polypeptids, die aus der äußeren Membran herausragen, in der das Protein verankert ist (ROSE *et al.*, 1980; ROSE u. GALLIONE, 1981). Auf ihnen sind bei gB und gD die Epitope lokalisiert, an die neutralisierende Antikörper binden (EISENBERG *et al.*, 1982; PELLET *et al.*, 1984).

In C-terminaler Richtung schließt sich eine Membranverankerungssequenz an.

Mit ihren hydrophoben Aminosäuren sorgt sie, wie ihr Name andeutet, für die Membranintegration des Glykoproteins und beeinflußt im Zusammenspiel mit der glykosylierten Region die richtige Orientierung des Polypeptids.
Schließlich verfügen die HSV-Glykoproteine am Carboxyterminus über eine Domäne, die kapsidwärts durch die Lipidschichten der Hülle hindurchragt. Bei gB fällt auf, daß auch dieser Bereich des Proteins außerordentlich lang ist (PELLET *et al.*, 1984).
Zusätzlich zur Glykosylierung sind gB, gC und gD sulfatiert (HOPF u. MARSDEN, 1983). Glykoprotein gE, ein Fc-Rezeptor (BAUCKE u. SPEAR, 1979), läßt sich mit radioaktivem Palmitat markieren, ein Befund, der nahelegt, daß an das Polypeptid Fettsäuren kovalent gebunden sind (JOHNSON u. SPEAR, 1983).

2.3.2 Synthese und Reifung

BALACHANDRAN und Mitarbeiter (1984) studierten die Synthesekinetiken einiger Glykoproteine des HSV-2 mit Hilfe der Immunpräzipitation. Sie fanden zuerst gB-2, gD-2 und gE-2 1-3 h *post infectionem* (p.i.), während gC-2 und gG-2 zu dieser Zeit kaum meßbar waren. Danach allerdings stieg ihre Syntheserate bis mindestens 11 h p.i. stetig an. Die Produktion von gD-2 und gE-2 fiel 5-7 h p.i. ab, wogegen gB-2 bis mindestens 11 h p.i. in wachsendem Ausmaß synthetisiert wurde. Einzelne über HSV-1 verfügbare Daten belegen analoge Ergebnisse für die korrespondierenden Glykoproteine (PAULI u. LUDWIG, 1977; SPEAR, 1985).
In Analogie zu anderen Membranproteinen wird angenommen, daß die Polypeptidkette der HSV-Glykoproteine an membrangebundenen Polysomen des rauhen endoplasmatischen Retikulum (RER) hergestellt und während der Verlängerung vektoriell in das Lumen des RER befördert wird, bis das Protein in der Membran verankert ist (BLOBEL *et al.*, 1979; KREIL, 1981). Ebenfalls kotranslational erfolgt die Addition N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide des mannosereichen Typs (PIZER *et al.*, 1980; WENSKE *et*

al., 1982; JOHNSON u. SPEAR, 1983; ZEZULAK u. SPEAR, 1983; MATHEWS *et al.*, 1983).

Verfolgt man die Reifung von Proteinen, die durch einen radioaktiven "pulse" markiert wurden, so fällt auf, daß die posttranslationale Prozessierung der Vorläuferproteine von einer deutlichen Abnahme der elektrophoretischen Mobilität in SDS-Polyacrylamidgelen 15 - 120 min nach der Synthese begleitet wird (SPEAR, 1976, BAUCKE und SPEAR, 1979, EISENBERG *et al.*, 1979; COHEN *et al.*, 1980; EBERLE u. COURTNEY, 1980; HAARR u. MARSDEN, 1981; WENSKE *et al.*, 1982; ZEZULAK u. SPEAR, 1983) Vermutlich beruht dieses Phänomen sowohl auf einem Anstieg des Molekulargewichtes durch die Addition von Oligosacchariden als auch auf Ladungsänderungen. Beide Ereignisse werden durch die Modifizierung des Kohlenhydratanteils der Glykoproteine bei der Reifung bewirkt Die Prozessierung der N-glykosidisch gebundenen Zucker des Polypeptids beginnt bereits im endoplasmatischen Retikulum mit dem Entfernen von drei Molekülen Glucose und einem Mannoserest von dem zunächst *in toto* angesetzten mannosereichen Oligosaccharid Die weitere Reifung erfolgt dann in räumlich und funktionell getrennten Reaktionsräumen des Golgi-Apparates, den Zisternen (ROTHMAN, 1985). Nach dem Abspalten weiterer Mannosereste werden N-Acetylglucosamin, Galactose und Sialinsäure angefügt. Die entstehenden Glykane des komplexen Typs bestehen somit aus einem Pentasaccharidkern (zwei Moleküle N-Acetylglucosamin, drei Molekule Mannose) und mehreren Seitenketten (Antennen), die meist die Zusammensetzung N-Acetylglucosamin-Galactose-Sialinsäure haben. Bei HSV-Glykoproteinen werden prozessierte Oligosaccharid-Seitenketten des di- und triantennären Typs vorgefunden, tetraantennäre Glykane fehlen (SERAFINI-CESSI *et al.*, 1984).

Die bei gC nachgewiesene O-glykosidische Bindung von Oligosacchariden an Serin- bzw. Threonin-Reste erfolgt gänzlich im Golgi-Apparat (BEYER *et al.*, 1981).

Experimente mit Zellinien, die defekte Glykosyltransferasen besitzen, zeigten, daß fast alle, wenn nicht alle Schritte während der Glykosylierung

und Reifung herpesviraler Glykoproteine durch zelluläre Enzyme katalysiert werden (CAMPADELLI-FIUME *et al.*, 1982, SERAFINI-CESSI *et al.*, 1983). Bei der HSV-Glykansynthese treten wirtszellabhängige Variationen während der Prozessierung auf, wie ein Vergleich der aus verschiedenen Wirtszellen gewonnenen Glykananteile ergab (CAMPADELLI-FIUME u. SERAFINI-CESSI, 1985). Studien, die den Effekt von Inhibitoren der Glykosylierung auf die Ausbeute an infektiösem Virus untersuchten, bewiesen, daß die Addition von Oligosacchariden des mannosereichen Typs bei zahlreichen Viren eine unabdingbare Voraussetzung für das Erreichen der Infektiosität darstellt (GILSON *et al.*, 1978; PIZER *et al.*, 1980). Die weiteren Veränderungen der Glykan-Zusammensetzung, die während der Reifung vollzogen werden, scheinen dagegen allenfalls geringen Einfluß auf die Ausbeute an replikationsfähigem Virus zu haben (CAMPADELLI-FIUME *et al.*, 1982; JOHNSON u. SPEAR, 1982; SERAFINI-CESSI *et al.*, 1983; KOUSOULAS et al., 1983a; KOUSOULAS *et al.*, 1983b). Jedoch sammeln sich unterglykosylierte Vorläufer bei Blockade der Prozessierung in den Kernen HSV-infizierter Zellen an (COMPTON und COURTNEY, 1984). Außerdem ist die Auschleusung fertiger Virionen offenbar von der vollständigen Reifung der HSV-Glykoproteine im Golgi-Apparat abhängig.

2.3.3 Funktion

Die wichtigste Aufgabe der Glykoproteine von Herpesviren besteht vermutlich darin, Adsorption und Penetration zu vermitteln. Die Adsorption kommt durch eine spezifische Interaktion im Envelope enthaltener glykosylierter Polypeptide mit zellulären Rezeptoren zustande (SPEAR, 1980). Wenn auch weder bei HSV noch bei anderen Herpesviren die Funktion der initialen Rezeptorbindung bisher eindeutig einem bestimmten Glykoprotein zugeordnet werden konnte, scheint festzustehen, daß gB und gC für die Adsorption nicht unbedingt benötigt werden (KELLER *et al.*, 1970; HEINE *et al.*, 1974;

MANSERVIGI *et al.*, 1977; SARMIENTO *et al.*, 1979). Daher werden für diesen Vorgang gD oder gE einzeln bzw. in Kombination verantwortlich gemacht. Kürzlich publizierte Ergebnisse von FULLER und SPEAR (1985) zeigten, daß gegen gD gerichtete monoklonale Antikörper die Adsorption von HSV-1 verhindern konnten.

Nach den Vorstellungen von MORGAN *et al.* (1968) wird die Penetration durch das Verschmelzen der Virushülle mit der Zellmembran eingeleitet; dabei erfolgt gleichzeitig die Einschleusung des Nukleokapsids ins Zytoplasma. Bei HSV wird für diesen Prozeß das Glykoprotein gB benötigt (MANSERVIGI *et al.*, 1977; SARMIENTO *et al.*, 1979).

Auch die Behüllung von Herpesviruskapsiden könnte an die Anwesenheit von Glykoproteinen gebunden sein, allerdings gibt es kaum Vorstellungen darüber, welche Polypeptide für das Envelopement notwendig sind (SPEAR, 1985). Lediglich die Involvierung von gC-1 kann ausgeschlossen werden, da gC-1-Mangelmutanten des HSV-Stammes MP vermehrungsfähig sind. Demgegenüber steht fest, daß die vollständig ablaufende Glykosylierung und Prozessierung notwendig sind, um die Ausschleusung fertiger Herpesvirionen aus der Zelle zu ermöglichen. Die Eigenschaft zahlreicher Viren, Zellen zu Polykaryozyten zu fusionieren, ist ebenfalls an eine intakte Glykoproteinsynthese gebunden (GALLAHER *et al.*, 1973; LUDWIG *et al.*, 1974). Auch für einige Synzytien induzierende HSV-Stämme konnte dies bestätigt werden (CAMPADELLI-FIUME *et al.*, 1982; SERAFINI-CESSI *et al.*, 1983). Temperatursensitive Mutanten gaben Hinweise darauf, daß gB-1 an der Induktion von Zellfusionen beteiligt ist (HONESS *et al.*, 1980; DELUCA *et al.*, 1982; KOUSOULAS *et al.*, 1984). Darüber hinaus legen die Ergebnisse von MANSERVIGI *et al.* (1977) den Schluß nahe, daß die Abwesenheit von gC zumindest teilweise für den fusionierenden Phänotyp verantwortlich sein könnte. Da es NOBLE und Mitarbeitern (1983) gelang, mit gD-1 spezifischen monoklonalen Antikörpern die Bildung von Synzytien in infizierten Vero-Zellen zu verhindern, ist offenkundig, daß auch gD an der Fusionsauslösung beteiligt ist.

Die für den medizinisch orientierten Virologen wichtigste Eigenschaft der Glykoproteine dürfte in ihrer Fähigkeit liegen, neutralisierende Antikörper zu induzieren. Zahlreiche Berichte über monoklonale Antikörper, die gegen Epitope auf gB, gC oder gD gerichtet sind und die Fähigkeit besitzen, HSV auch in Abwesenheit von Komplement zu inaktivieren, wurden veröffentlicht (PEREIRA *et al.*, 1980; SHOWALTER *et al.*, 1981; RECTOR *et al.*, 1981; BALACHANDRAN *et al.*, 1982, EISENBERG *et al.*, 1982, HOLLAND *et al.*, 1983). Gegen gE gerichtete Antikörper dagegen neutralisieren HSV nur in Gegenwart von Komplement (NORRILD, 1980).

Wie aus den Ausfuhrungen ersichtlich, ist eine Reihe von Eigenschaften der Herpesvirus-Glykoproteine bekannt. So wurde die Aminosäuresequenz einiger Polypeptide ermittelt und Domänen auf ihnen definiert, an die bestimmte biologische Funktionen gebunden sind, jedoch sind die Kenntnisse über die Interaktion der viralen Proteine untereinander und mit der Zelle noch gering. Untersuchungen zahlreicher Forschungsgruppen beschäftigen sich daher mit dem Problemkreis, um präzisere Informationen über diese bei der Infektion bzw. Immunabwehr wichtigen Antigene zu erhalten.

3 PROBLEMSTELLUNG

Kreuzreagierende Oberflächenantigene verschiedener Herpesviren wurden in der Vergangenheit unter Zuhilfenahme von Rekonvaleszenten- bzw Hyperimmunseren untersucht. Da die Hybridoma-Technik eine genauere Eingrenzung der verwandten Determinanten versprach, sollten im Rahmen dieser Arbeit

1. monoklonale Antikörper gegen SHV-1 hergestellt und charakterisiert,

2. BHV-2- und HSV-spezifische monoklonale Antikörper charakterisiert und

3. Epitope auf Hüllproteinen von SHV-1, BHV-2, HSV-1 sowie HSV-2 ausfindig gemacht und das Ausmaß ihrer Kreuzreaktivität näher bestimmt werden.

Dazu war es notwendig, Daten über biologische (z.B. neutralisierende) Eigenschaften der Antikörper zu erheben, die von ihnen erkannten Antigene in infizierten Zellen und gegebenenfalls am Virus zu lokalisieren sowie einige ihrer biochemischen Charakteristika (z.B. Molekulargewicht, Glykosylierung, Synthesekinetik) zu ermitteln.

Die Ergebnisse sollten dazu dienen, genauere Kenntnisse über hochkonservierte, möglicherweise auch funktionell gleiche Domänen auf Glykoproteinen verschiedener Herpesviren zu erarbeiten. Sie können zu einem besseren Verständnis des Ablaufs von Synthese und Reifung sowie der Funktion viraler Hüllproteine beitragen und die Grundvoraussetzungen schaffen, um in naher Zukunft Tot- bzw. Spaltimpfstoffe mit definierten kreuzreagierenden Epitopen zu produzieren.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Viren

Eine Übersicht über die in den Untersuchungen verwendeten Viren ist im folgenden wiedergegeben (Tab. 1).

Virus	Kurzbezeichnung/Stamm	Isolat aus	Referenz
Bovines Herpesvirus Typ 1 (BHV-1)	B_1	Vagina, $\leq$ 15 Passagen	GREGERSEN, *et al.* 1985; erhalten von Dr. Geilhausen, Leverkusen
Bovines Herpesvirus Typ 2 (BHV-2)	BMV	Mammillitis	erhalten von Prof. B. Roizman, Chicago
BHV-2	TVA	Mammillitis	RWEYEMAMU *et al.*, 1966
Equines Herpesvirus Typ 1 (EHV-1)	Army 183	Respirationstrakt	CHOWDHURY *et al.*, 1986; erhalten von Dr. P. Thein, Leverkusen
Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1)	F	Herpes facialis	EJERCITO *et al.*, 1968
Herpes simplex Virus Typ 2 (HSV-2)	G	Herpes genitalis	EJERCITO *et al.*, 1968
Suid Herpesvirus Typ 1 (Pseudorabies Virus, SHV-1)	DEK		LUDWIG, 1972;isoliert von Dr.F.Dekking, Amsterdam
SHV-1	DESSAU	Zellkulturattenuierter Impfstamm	erhalten von Prof.B.Toma, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Tabelle 1 : Herkunft und Bezeichnung der verwendeten Virusstämme.

4.2 Zellkulturen

4.2.1 Chemikalien, Lösungen, Medien und Seren

Chemikalien und Reagenzien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen, soweit nicht anderslautend vermerkt.

PBS (phosphate buffered saline): 8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,12 g KH_2PO_4; 0,91 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$; Aqua dest. ad 1000,0 ml; pH 7,5 einstellen.

Trypsinlösung: 2,5 g Trypsin (Difco Laboratories, Detroit, USA); 2 x 10^5 I.E. Penicillin-G (Kaliumsalz) (Sigma, Taufkirchen); 50 mg Streptomycinsulfat (Sigma) ; PBS ad 1000,0 ml; pH 7,4 mit NaOH einstellen, sterilfiltrieren und bis zum Gebrauch bei 4°C lagern bzw. bei -20°C einfrieren.

Kulturmedium: Eagle's minimum essential medium, Dulbecco's modification (EDM, Gibco, Glasgow, Schottland) unter Zusatz von 50 IE/ml Penicillin-G (Kaliumsalz) (Sigma) und 100 µg/ml Streptomycinsulfat (Sigma).

Seren für die Zellkultur: Fetales Kälberserum (FKS; Gibco); Serum neugeborener Kälber (newborn calf serum, NCS; Gibco)

4.2.2 Zellkultur

Um dem Wirtsspektrum der einzelnen Viren gerecht zu werden, wurden die Virusstämme in den in der Tabelle 2 angegebenen permanenten Zellinien vermehrt.

Infizierte A31B77-Zellen, eine von Balb/c-Mäusen stammende, mit Rous Sarcom Virus Stamm B77 transformierte Zellinie (LIEBER u. TODARO, 1973),

verwendete ich zur Herstellung von Lysaten, die zum Immunisieren von Balb/c-Mäusen dienten. Georgia bovine kidney (GBK) - eine Rindernierenepithelzellinie -, mink lung (ML) - Nerzlungenzellen - und Vero-Zellen - eine Zellinie von Nierenepithelzellen afrikanischer grüner Meerkatzen -, dienten zur Vermehrung von Viren für die im folgenden näher beschriebene Zwecke. Alle genannten Zellinien wurden in EDM mit einem Zusatz von 5 % (v/v) NCS gehalten. Beim letzten Passagieren vor der Infektion ersetzte ich das NCS-haltige Medium durch Nährmedium mit 5 % (v/v) FKS. Als Kulturgefäße dienten Kunststoffschalen verschiedener Größe (NUNC, Roskilde, Dänemark).

Zum Passagieren der Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen kurz mit Trypsinlösung gewaschen und erneut benetzt. Nach 10 bis 20 min Inkubation bei 37°C konnten die Einzelzellen in Medium resuspendiert und in neue Kulturgefäße überführt werden. Wenn mit definierter Zellzahl bei der Aussaat gearbeitet werden mußte, bestimmte ich die Zellzahl in einem Coulter Counter (Modell ZF, Coulter Electronics, England). Alle Zellkulturen wurden in einem mit 5% CO_2 begasten Feuchtbrutschrank bei 37°C inkubiert.

Virus (Stamm)	Zellinie
BHV-1 (B_1)	GBK
BHV-2 (BMV)	GBK, Vero
BHV-2 (TVA)	GBK
EHV-1	GBK
HSV-1 (F)	Vero
HSV-2 (G)	Vero
SHV-1 (DEK)	A31B77, GBK, ML, Vero
SHV-1 (Dessau)	A31B77, GBK, ML, Vero

Tab. 2 Zellinien und die in ihnen vermehrten Viren

4.3 Virusvermehrung in der Zellkultur

4.3.1 Infektion der Zellkulturen

Von konfluent gewachsenen Zellrasen wurde das Medium abgesaugt. Anschließend wusch ich die Zellen mit PBS und gab die benötigte Virusmenge zu. Sofort danach und im weiteren alle 15 min wurden die Kulturschalen vorsichtig geschwenkt, um das Inokulum gleichmäßig auf dem Zellrasen zu verteilen. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37°C saugte ich nicht adsorbiertes Virus ab und wusch die Kultur mit PBS. Anschließend erfolgte die Zugabe von FKS-supplementiertem Medium.

Zur Produktion von Vorratsvirus wurden die Zellkulturen mit niedriger Infektionsmultiplizität (multiplicity of infection, m.o.i.) beimpft (10^{-3} plaquebildende Einheiten [PBE] pro Zelle), um das Auftreten defekter Partikel zu vermeiden (UCHIDA *et al.*, 1966; COLE *et al.*, 1971). Zur Herstellung von Lysaten aus infizierten Zellen wählte ich im allgemeinen eine hohe m.o.i (1 bis 10 PBE/Zelle), um eine möglichst vollständige Abschaltung der Biosynthese von wirtszellspezifischen Proteinen innerhalb kurzer Zeit zu gewährleisten. Diese Überlegung fand besonders bei der Herstellung radioaktiv markierter Lysate Berücksichtigung. Lediglich zur Produktion von Lysaten aus BHV-2-infizierten Zellen mußte auf eine geringere Infektionsmultiplizität zurückgegriffen werden, da die Virustiter für eine Infektion mit 1 bis 10 PBE/Zelle nicht ausreichten.

4.3.2 Virusernte

Für die Herstellung von Vorratsvirus erfolgte die Virusernte zum Zeitpunkt der maximalen Virusausbeute (GREGERSEN, 1983; STERZ u. LUDWIG, 1972; BUND, 1983). Die infizierten Zellen wurden durch dreimaliges Frieren (-70°C)

und Tauen (Raumtemperatur, RT) aufgeschlossen, um zellgebundenes Virus freizusetzen. Nach 10 min Zentrifugation bei 3000 UpM (Minifuge Heraeus Christ, Osterode) wurde der zellfreie Überstand portioniert und bei -70°C gelagert oder sofort zur Virusreinigung eingesetzt. Überstände, die als Vorratsvirus vorgesehen waren, titrierte ich im Plaquetest (s. 4.4.2).

4.3.3 Gewinnung radioaktiv markierter Glykoproteine

Zellen wurden mit hoher m.o.i. (10 PBE/Zelle) infiziert. 4 Stunden p.i. wurde das jeweilige Medium gegen 3,0 ml eines anderen ersetzt, das die zur Biosynthese von Glykoproteinen von der Zelle verwendeten radioaktiven Aminozucker und Fructose anstelle von Glucose (100 µCi/ml [6-^{3}H]-Glucosamin-hydrochlorid, spezifische Aktivität: 20,2 Ci/mmol; New England Nuclear, Dreieich) enthielt. Die Herstellung von Lysaten aus den radioaktiv markierten infizierten Zellen erfolgte nach Ausbildung eines fortgeschrittenen zytopathischen Effektes.

4.4 Plaquetest

4.4.1 Lösungen

Overlaymedium: 8,0 g Carboxymethylcellulose-Natriumsalz (Serva, Heidelberg) wurden in einer 500 ml Glasflasche zusammen mit einem Rührstab autoklaviert (121°C, 45 min) und durch Rühren über Nacht in 500 ml EDM gelöst. Danach erfolgte die Zugabe von 10,0 ml FKS.

4 % (v/v) Formaldehydlösung: 10,8 ml 37% Formaldehyd; Aqua dest. ad 100,0 ml

Färbelösung: Giemsa-Lösung für die Mikroskopie

4.4.2 Plaquetest

Virussuspensionen wurden logarithmisch zur Basis 10 in FKS-haltigem Medium verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe überführte ich je 0,2 ml in zwei Vertiefungen einer 24-Loch-Multischale (NUNC, Roskilde, Dänemark), pipettierte in jede Vertiefung etwa $4x10^5$ Zellen und inkubierte das Virus-Zell-Gemisch 4 Stunden bei 37°C, um den Zellen Gelegenheit zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens zu geben. Nach Zugabe von Overlaymedium (0,8 % CMC-Endkonzentration), das zur Verhinderung der extrazellulären Virusausbreitung diente, wurden die Testansätze bis zur Ausbildung makroskopisch auswertbarer Plaques (24 bis 48 Stunden) weiterinkubiert. Die Fixierung erfolgte mit 4 % Formaldehydlösung in PBS (30 min, RT), anschließend wurde 30 min mit Giemsa-Lösung gefärbt.
Nach dem Auszählen der Plaques erfolgte die Berechnung des Virustiters der Ausgangssuspension durch Multiplikation der ermittelten Plaquezahl mit dem Verdünnungsfaktor unter Berücksichtigung des inokulierten Volumens. Titerangaben erfolgten als plaquebildende Einheiten pro Milliliter (PBE/ml). Die verwendete Methode entspricht in ihren Grundzügen dem von STERZ und LUDWIG (1972) publizierten Verfahren.

4.5 Virusreinigung

4.5.1 Lösungen

1 M Tris-HCl, pH 7,4: 121,14 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; Aqua dest. ad 1000,0 ml; pH 7,4 mit HCl einstellen.

0,2 M EDTA, pH 7,2: 74,5 g Ethylendiamintetraacetat, Natriumsalz; Aqua dest. ad 1000,0 ml; pH 7,2 mit HCl einstellen.

Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer): 10,0 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4; 15,0 ml 0,2 M EDTA, pH 7,2; Aqua dest. ad 1000,0 ml

20 % (w/v) Saccharose in TE-Puffer: 20,0 g Saccharose; 1,0 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4 ; 1,5 ml 0,2 M EDTA, pH 7,2 ; Aqua dest. ad 100,0 ml

70 % (w/v) Saccharose in TE-Puffer: 70,0 g Saccharose; 1,0 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4 ; 0,2 M EDTA, pH 7,2 1,5 ml; Aqua dest. ad 100,0 ml

80 % (w/v) Saccharose in TE-Puffer: Saccharose 80,0 g; 1 M Tris-HCl, pH 7,4 1,0 ml; 1,5 ml 0,2 M EDTA, pH 7,2 ; Aqua dest. ad 100,0 ml; Zucker durch leichtes Erwärmen lösen.

4.5.2 Virusreinigung

Zellfreien Kulturüberstand zentrifugierte ich 10 min bei 8000 UpM im GSA-Rotor (Sorvall), um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in Zentrifugenröhrchen (SW 28, Beckmann, Palo Alto, USA) über ein 10 ml umfassendes Saccharosekissen (20 % Saccharose in TE-Puffer) geschichtet

und 2 Stunden bei 27 000 UpM ultrazentrifugiert. Das pelletierte Virus resuspendierte ich in 1,0 ml TE-Puffer und reinigte es anschließend in einem kontinuierlichen Gradienten von 20 bis 70 % Saccharose, der mit einem Kissen von 0,5 ml 80 % Saccharose unterschichtet worden war. Der Gradient war mittels eines Gradientenmischers aus 5,2 ml 20 % Saccharose in TE-Puffer und 4,8 ml 70 % Saccharose in TE-Puffer hergestellt und über eine Schlauchpumpe in Zentrifugenröhrchen (SW 41, Beckmann Instruments, München) gefördert worden. Nach dem Aufschichten der Virusprobe über den Gradienten erfolgte eine mindestens 16-stündige Ultrazentrifugation bei 35 000 UpM. Die während des Gleichgewichtslaufes ausgebildeten Banden wurden einzeln mit Hilfe einer Glaskapillare abgesaugt oder der gesamte Gradient in Fraktionen zu 700 µl ausgetropft, die Dichten der Proben in einem Gauß-Refraktometer bestimmt und die Qualität des gereinigten Virus nach Negativ-Kontrastierung einer kleinen Probe elektronenoptisch überprüft. Virushaltige Fraktionen wurden vereinigt und nach Verdünnung in TE-Puffer pelletiert (60 min, 35 000 UpM, SW 50.1, Beckmann).

4.6 Antiseren

Einige polyvalente Seren benutzte ich zum Vergleich mit monoklonalen Antikörpern. Als Referenzseren für Experimente mit BHV-2 dienten AS 8, ein bovines Rekonvaleszentenserum, und S 297, ein Schaf-Hyperimmunserum. Die Seren wurden mir aus der Institutssammlung überlassen. Außerdem stand mir ein ein von Frau Dr. B. Norrild hergestelltes Kaninchen-Hyperimmunserum (Anti-Antigen 11) mit Spezifität für das Glykoprotein gB des HSV zur Verfügung. Die Eigenschaften dieses Serums sind beschrieben (NORRILD *et al.*, 1977).

Seren uninfizierter Balb/c-Mäuse dienten als Negativ-Kontrollen bei verschiedenen Experimenten.

4.7 Herstellung monoklonaler Antikörper

4.7.1 Zellysate zum Immunisieren

4.7.1.1 Lösungen

1 M Tris-HCl, pH 7,4: (s. 4.5.1)

10 % (w/v) Natriumdesoxycholat-Lösung (10 % DOC): 10,0 g Natriumdesoxycholat; Aqua dest. ad 100,0 ml

Lysispuffer A: 20,0 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4; 2,9 g Natriumchlorid; 5,0 g Nonidet-P 40 (Fluka, Neu-Ulm); Aqua dest. ad 1000,0 ml

4.7.1.2 Zellysate

A31B77-Zellen wurden ab dem 3. Tag vor der Infektion mit serumfreiem Medium versorgt, um den Serumanteil der für Immunisierungszwecke vorgesehenen Lysate auf ein Minimum zu begrenzen. Die Infektion der Zellen erfolgte mit einer m.o.i. von 1 PBE/Zelle SHV-1 (DEK). Nachdem sich innerhalb von 24 h p.i. ein fortgeschrittener cytopathischer Effekt eingestellt hatte, wurden die Zellen einer Petrischale von 8,5 cm Durchmesser mit PBS gewaschen und 15 min mit 4 ml eiskaltem Lysispuffer A behandelt. Nach der Zugabe von 0,2 ml 10 % DOC (Endkonzentration 0,5 %) wurden die Lysate 60 min bei 35000 UpM ultrazentrifugiert (SW 50.1, Beckman). Die Überstände wurden portioniert und bis zum Gebrauch bei -70°C gelagert.

4.7.2 Immunisierung von Balb/c-Mäusen

Zwei bis drei Monate alte weibliche Balb/c-Mäuse immunisierte ich mit Lysaten aus SHV-1-infizierten A31B77-Zellen. Die Mäuse stammten aus der Zucht des Instituts für Klinische und Experimentelle Virologie der Freien Universität Berlin und wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. Hartmut Hampl, dem ich an dieser Stelle danken möchte, zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden in Makrolon®-Käfigen (Becker, Castrop-Rauxel 2) gehalten und mit Pelletfutter (MRH für Mäuse, Eggersmann) und Wasser ad libitum versorgt. Zur Immunisierung einer Maus wurden 0,4 ml Lysat (s. 4.7.1.2) mit gleichem Volumen Adjuvans (FREUND, 1951) emulgiert und intraperitoneal verabreicht. Dabei galt folgendes Schema:

1. Tag: Blutentnahme (ca.300 µl)
Grundimmunisierung mit Freund's Adjuvans, complete (Gibco, Glasgow, Schottland)

15. Tag: Blutentnahme (ca. 200 µl)
Boosterinjektion mit Freund's Adjuvans, incomplete

29. Tag: Blutentnahme (ca. 200 µl)
Boosterinjektion mit Freund's Adjuvans, incomplete

43. Tag: Blutentnahme (ca. 200 µl)

57. Tag: Blutentnahme (ca. 200 µl)

71. Tag: Blutentnahme (ca. 200 µl)

5. Tag vor Milzentnahme: Boosterinjektion mit Freund's Adjuvans, incomplete

Die Blutentnahmen erfolgten aus dem orbitalen Venenplexus, der mittels einer Glaskapillare (Desaga Mikrokapillare, 10 µl, Desaga, Heidelberg) vom lateralen Augenwinkel her punktiert wurde.

Die aus den Blutungen gewonnenen Seren wurden im Neutralisationstest eingesetzt. Die Titerentwicklung ist in Abbildung 5 zusammengefaßt.

Das Absinken der Antikörpertiter wurde abgewartet, bevor eine letzte Boosterinjektion am 5. Tag vor der Gewinnung der Milzzellen der immunisierten Tiere erfolgte. Durch dieses Verfahren wurden mit der letzten Verabreichung von Antigen vornehmlich Gedächtniszellen aktiviert, so daß zum Zeitpunkt der Milzentnahme vermehrt Prolymphozyten erwartet werden konnten, die sich besonders gut zum Etablieren Antikörper-produzierender Hybridoma-Zellinien eignen sollen (GODING, 1983).

4.7.3 Herstellung von Hybridoma-Kulturen

4.7.3.1 Lösungen, Chemikalien, Medien

Hypoxanthin-Thymidin-Lösung (HT-Lösung): 136,1 mg Hypoxanthin (6-Hydroxypurin; Sigma,Taufkirchen); 37,8 mg Thymidin (Sigma); Aqua dest. ad 100,0 ml. Hypoxanthin und Thymidin in destilliertem Wasser durch Erwärmen lösen, sterilfiltrieren und portioniert bei -20°C lagern.

Aminopterin-Lösung: 1,76 mg Aminopterin in einen 100 ml Glasmeßzylinder einwiegen und etwa 90 ml destilliertes Wasser hinzufügen. Nach Zugabe von 0,5 ml 1 N Natronlauge löst sich das Aminopterin leicht. Die Lösung mit 0,5 ml 1 N Salzsäure neutralisieren und das Volumen mit destilliertem Wasser auf 100,0 ml einstellen. Nach Sterilfiltration portioniert bei -20°C lagern.

ACK-Lösung: Ammoniumchlorid 8,3 g; Aqua dest. ad 1000,0 ml; pH 7,0 mit KOH einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.

Penicillin-Streptomycin-Lösung (PS-Lösung): 1 x 10^6 I.E. Penicillin-G, Kaliumsalz (Sigma); Streptomycinsulfat (Sigma) 0,7 g; Aqua dest. ad 100,0 ml; sterilfiltrieren und portioniert bei -20°C lagern.

Polyethylenglykol (PEG): 3 g Polyethylenglykol, Molekulargewicht 1500 (Serva, Heidelberg) in einem 25 ml Erlenmeyerkolben autoklavieren (121°C, 45 min).

Kulturmedium A: 50,0 ml FKS (Gibco); RPMI Medium 1640 (Gibco) ad 500,0 ml

Kulturmedium B (HT-Medium): 5,0 ml Hypoxanthin-Thymidin-Lösung; 5,0 ml 100 mM Natriumpyruvat-Lösung (Gibco); 5,0 ml 200 mM L-Glutamin-Lösung; 0,5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung; 100,0 ml FKS; RPMI Medium 1640 ad 500,0 ml

Kulturmedium C (HAT-Medium): 1,0 ml Hypoxanthin-Thymidin-Lösung; 1,0 ml Aminopterin-Lösung; 1,0 ml 100 mM Natriumpyruvat-Lösung; 1,0 ml 200 mM L-Glutamin-Lösung; 0,2 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung; 20,0 ml FKS; 20,0 ml NS-1 Ag4/1 Kulturüberstand; RPMI Medium 1640 ad 100,0 ml; vor Gebrauch frisch ansetzen.

4.7.3.2 Myelomzellen

In Gegenwart von 8-Azaguanin bzw. 5-Brom-desoxyuridin auf Enzymdefekte der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) und der Thymidinkinase (TK) selektionierte NS1-Ag4/1 (NS-1) Myelomzellen wurden mir dankenswerterweise von Frau H. Jordanski, Robert-Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes, Berlin überlassen. Die Vermehrung der Zellen erfolgte in Plastikpetrischalen (NUNC) unter Verwendung von Kulturmedium A. Um optimales Wachstum zu gewährleisten, wurden die Zellen in einem Bereich von 10^4 bis 10^5 Zellen/ml Medium gehalten. Sobald diese Zelldichte überschritten war, wurden die Zellen nach Resuspendieren auf eine adäquate Anzahl neuer Kulturgefäße verteilt und mit Medium versorgt. Die Fusionierung von Myelom- mit Milzzellen erfolgte unter Verwendung von NS-1 Kulturen, die

sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden.

4.7.3.3 Splenektomie und Aufbereitung der Milzzellen

Einer 5 Tage vor der Entnahme der Milz geboosterten Maus wurden 600 bis 1000 µl Blut entnommen. Nach Tötung des Tieres erfolgte die Splenektomie unter aseptischen Kautelen. Zur Isolierung der Milzzellen wusch ich das Organ zunächst in Kulturmedium A, verpackte es in ein autoklaviertes Nylonnetz und überführte es in eine Gewebekulturschale mit 5 ml Kulturmedium B. Mittels zweier gebogener Pinzetten ließen sich die Milzzellen durch die Maschen des Netzes ausstreifen und mit dem Medium in ein konisches 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner, Nürtingen) überführen. Das Ausstreifen der Milz wurde zweimal in frischem Medium wiederholt und das Nylonnetz mit dem zurückgebliebenen Kapsel- und Stützgewebe nochmals mit 2 ml Kulturmedium B gespült, um die Ausbeute an Milzzellen zu optimieren.
Nach dem Pelletieren der Milzzellen (8 min, 1000 UpM, Minifuge, Heraeus Christ, Osterode) erfolgte das Lysieren der im Pellet enthaltenen Erythrozyten. 1,0 ml ACK-Lösung wurden unter vorsichtigem Schwenken des Zentrifugenröhrchens langsam zugesetzt. Nach einer Einwirkdauer von 60 s wurde das Röhrchen mit RPMI-Medium 1640 auf 40 ml aufgefüllt. Nach erneutem Abzentrifugieren der Zellen (8 min, 1000 UpM) und Entfernen des Überstandes erfolgte ein Waschschritt in serumfreiem RPMI Medium. Serumfreies Medium setzte ich ein, um das Ausfallen von Serumproteinen in Gegenwart von Polyethylenglykol zu verhüten.

4.7.3.4 Aufarbeitung der Myelomzellen

Zeitgleich mit der Vorbereitung der Milzzellen resuspendierte ich ca. 10^8

Myelomzellen in ihrem Kulturmedium, überführte sie in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) und zentrifugierte sie 8 min bei 1000 UpM. Die Überstände wurden steril filtriert und portioniert bei -20°C bzw. 4°C gelagert, wenn sie zum baldigen Verbrauch bestimmt waren. Sie dienten zum Konditionieren des Mediums der Hybridomakulturen. Nach dem Resuspendieren des Zellpellets in etwa 10 ml RPMI Medium 1640 vereinigte ich die Zellen in einem Zentrifugenglas und zentrifugierte sie ab (8 min, 1000 UpM). Die Myelomzellen wurden nochmals in serumfreiem RPMI Medium gewaschen und anschließend in 10,0 ml RPMI Medium aufgenommen (ebenfalls serumfrei).

4.7.3.5 Fusionieren von Myelom- und Milzzellen

3 g steriles PEG wurden in einem Wasserbad bei 56°C geschmolzen und in 4,0 ml auf 37°C vorgewärmtem RPMI Medium 1640 gelöst. Die aufbereiteten Milzzellen (s. 4.7.3.3) wurden in 10,0 ml RPMI Medium resuspendiert, mit den Myelomzellen vereinigt und abzentrifugiert (8 min, 1000 UpM). Nachdem das Zellpellet sorgfältig trockengesaugt worden war, erfolgte tropfenweise die Zugabe von 0,6 ml PEG-Lösung in RPMI Medium unter vorsichtigem Schwenken des Röhrchens. Die Suspension wurde sofort danach 6 min bei 900 UpM zentrifugiert, der PEG-haltige Überstand abgesaugt und zunächst 5 ml RPMI Medium, um das Polyethylenglykol auszuverdünnen, dann 5 ml Kulturmedium B zugegeben. Nach vorsichtigem Resuspendieren der Zellen und erneutem Abzentrifugieren (8 min, 900 UpM) nahm ich das Pellet in 100 ml Kulturmedium B auf, das mit 20 % (v/v) NS-1 Kulturüberstand konditioniert worden war. Je 50 µl der Zellsuspension wurden in die Vertiefungen von 20 Microtiterplatten (NUNC) mittels einer Tropfpipette (Flow Laboratories, Bonn) ausgesät und im weiteren bei 37°C im CO_2-Feuchtbrutschrank inkubiert.

4.7.3.6 Selektionieren der Hybridoma-Zellen

24 Stunden nach der Zellaussaat erhielt jede Vertiefung der Microtiterplatten 25 µl Kulturmedium B, das neben 20 % NS-1 Kulturüberstand 3 % (v/v) Aminopterin-Lösung enthielt, wodurch im gesamten Zellkulturüberstand eine Aminopterin-Konzentration von 4×10^{-7} M eingestellt wurde.
Aminopterin bewirkt als Folsäureantagonist eine Blockade des Hauptweges zur Biosynthese der Purinnukleotide und verhindert die Methylierung von Uridin zu Thymidin. Die kompetitive Hemmung der Funktionen der Tetrahydrofolsäure zwingt die Zelle, auf den Hilfsweg der Wiederverwertung von Purin- und Pyrimidinbasen zurückzugreifen, die beim Nukleinsäureabbau in der Zelle entstehen, oder sich exogen zugeführte Vorstufen bzw. Zwischenprodukte des Nukleinsäurestoffwechsels (Hypoxanthin, Thymidin) nutzbar zu machen. Die genetische Information der zum Beschreiten dieses Hilfsweges notwendigen Enzyme HGPRT und TK ist in Lymphozyten vorhanden und wird bei der Fusion normalerweise in die entstehende Hybridomazelle eingebracht. Damit ist diese Zelle in der Lage, die Blockade der Nukleinsäuresynthese zu durchbrechen und sich zu replizieren. Die Myelomzellen waren jedoch wie erwähnt auf einen Defekt hinsichtlich HGPRT und TK selektioniert, so daß ihnen in Gegenwart von Aminopterin jede Möglichkeit zur weiteren Nukleinsäuresynthese und damit zur Vermehrung genommen ist. Die Verwendung eines Hypoxanthin, Thymidin und Aminopterin enthaltenden Selektionsmediums führt also dazu, daß Myelomzellen, die nicht mit HGPRT- und TK-positiven Zellen fusioniert sind, absterben. Milzzellen, insbesondere Lymphozyten, die nicht durch Fusion mit einer Myelomzelle immortalisiert worden sind, überleben nur wenige Tage in der Zellkultur. Somit sind lediglich Hybridomazellen, die über die Enzyme HGPRT und TK verfügen, imstande, dauerhaft im Selektionsmedium zu überleben.

4.7.4 Kultivierung von Antikörper-produzierenden Hybridomazellen

4.7.4.1 Kultivieren in der Anfangsphase

Die nach der Fusionierung angelegten Zellkulturen hielt ich 14 Tage lang unter Selektionsmedium (HAT-Medium). Nach dieser Frist wurde für zwei weitere Wochen auf HT-Medium gewechselt.

Die Kulturen versorgte ich zunächst alle zwei Tage mit frischem Kulturmedium, das mit 10 % NS-1 Kulturüberstand konditioniert worden war. Eine makroskopische Überprüfung aller Kulturgefäße erfolgte täglich (Feststellen etwaiger Kontaminationen, Überprüfung des Mediums). Außerdem wurde jeden Tag ein Teil der 1920 Einzelkulturen mikroskopisch (Olympus CK, Tokyo, Japan) untersucht, um das Wachstum von hybridomaverdächtigen Kolonien zu verfolgen. Nach der Entstehung von Zellklonen ab dem 5. bis 8. Tag nach der Fusionierung ließ sich die weitere Versorgung der Zellen mit Kulturmedium aufgrund des Ergebnisses der täglichen Inspektion vornehmen. Wenn in den Kavitäten der Microtiterplatten ein Mediumspiegel erreicht war, der 250 µl überstieg, erfolgte ein Mediumwechsel. Dazu wurden 100 µl Kulturüberstand mit Hilfe einer Multikanalpipette (Titertek, Flow Laboratories, Bonn) abgehoben und im ELISA (s. 4.10.1) auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper getestet, oder ein etwa gleiches Volumen alten Mediums wurde mittels einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen.

4.7.4.2 Testen auf die Produktion spezifischer Antikörper

Sobald in Kulturgefäßen Klone von 30 bis 40 Zellen ausgebildet waren, wurden 50 bis 100 µl Kulturüberstand mit einer Multikanalpipette steril aus jeder Vertiefung der Microtiterplatten entnommen und in dem unter 4.10.1 näher beschriebenen "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA) auf den Gehalt an

spezifischen Antikörpern untersucht. Die Tests, die ich etwa 10 bis 14 Tage nach dem Fusionierungstermin aufnahm und wöchentlich einmal wiederholte, dienten dazu, Antikörper produzierende Hybridoma-Kulturen frühzeitig zu erfassen, um sie kontrolliert pflegen zu können. Beim Testen wurde so verfahren, daß abwechselnd einerseits Antikörper gegen zellinterne Antigene, und andererseits Antikörper nachgewiesen wurden, die gegen Epitope in der Plasmamembran infizierter Zellen gerichtet sind.
Im weiteren Verlauf testete ich die Hybridoma-Kulturen jeweils vor dem Passagieren, Einfrieren, dem Reinigen von Antikörpern aus großen Mengen Kulturüberstands und mehrfach während des Klonierens auf Antikörperproduktion im ELISA.

4.7.4.3 Vermehrung von Hybridoma-Kulturen

Kulturen, in denen spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten, wurden in größere Kulturgefäße passagiert, wenn Kolonien von mindestens 80 bis 120 Zellen herangewachsen waren. Dazu überführte ich die Zellen nach gründlichem Resuspendieren mit einer Pasteurpipette in die Vertiefung einer 24-Loch-Multischale (NUNC) und versorgte sie mit 300 µl frischem Kulturmedium B. Die entleerte Vertiefung in der Microtiterplatte konnte wieder mit 100 µl Medium gefüllt werden, um den wenigen verbliebenen Hybridoma-Zellen Gelegenheit zum Weiterwachsen zu geben. Dieses Verfahren erwies sich besonders dann als vorteilhaft, wenn die passagierten Zellen die Produktion von Antikörpern einstellten oder zugrunde gingen. Es bestand dann die Möglichkeit, auf die Ausgangskulturen zurückzugreifen und die Vermehrung der Zellen erneut zu versuchen. Die Kulturen in den 24-Loch-Multischalen wurden analog zu den Ausgangskulturen täglich beobachtet und entsprechend der Vermehrung der Zellen zunächst auf mehrere Vertiefungen der Multischale verteilt, dann in Plastik-Petrischalen (5 cm Durchmesser, NUNC) oder 25 ml

Gewebekulturflaschen (Falcon®, Div. Becton Dickinson & Co., Oxnard, Kalifornien, USA) weiter passagiert.

4.7.4.4 Klonieren

Die Klonierung der Hybridoma-Zellen diente im wesentlichen zwei Zwecken. Erstens sollten Hybridomakulturen etabliert werden, die von einer einzelnen Zelle abstammten und genetisch einheitliche, also monoklonale Antikörper produzierten. Zweitens wurden mit der Klonierung diejenigen Hybridoma-Linien selektioniert, die hinsichtlich Antikörper-Produktion und Wachstum stabil waren.

Das Klonieren Antikörper sezernierender Hybridomas erfolgte nach der Endverdünnungsmethode, indem 100 µl Hybridoma-Suspension mit einer Zelldichte von 10^3 bis 10^4 Zellen/ml in Zehnerschritten in konditioniertem Kulturmedium B verdünnt wurden. Die Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-4} wurden mit einer 50 µl Tropfpipette (Flow Laboratories) in die Vertiefungen einer Microtiterplatte ausgesät. Die Aufzucht der Hybridoma-Klone erfolgte wie unter 4.7.4.1 bis 4.7.4.3 beschrieben, abgesehen davon, daß die Zellen nicht mehr der Aminopterin-Behandlung unterzogen wurden.

4.7.4.5 Einfrieren von Hybridoma-Zellen

4.7.4.5.1 Medium

Einfriermedium: Dimethylsulfoxid 1,0 ml; FKS ad 10,0 ml; auf 4°C kühlen.

4.7.4.5.2 Behandlung der Zellen

Hybridomas, die in Petrischalen (5 cm ø) oder 25 ml Gewebekulturflaschen bis zur kritischen Zelldichte herangewachsen waren, wurden in 3 bis 4 Petrischalen passagiert, um sicherzustellen, daß die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase eingefroren wurden. Am Tag nach dem Passagieren zentrifugierte ich die resuspendierten Zellen 10 min bei 1000 UpM ab (Minifuge, Heraeus Christ). Der Überstand wurde nochmals auf seinen Antikörpergehalt getestet und ggf. bei -20°C gelagert. Etwa 10^7 Zellen suspendierte ich in 3 ml Einfriermedium und füllte sie in Plastikampullen zu je 1 ml ab, die ich dann luftdicht verschloß. Sofort danach wurden die Ampullen in einer mindestens 1 cm dicken Zellstofflage verpackt, um die Zellen langsam und gleichmäßig bei -70°C einfrieren zu können. Tiefgefrorene Hybridoma-Zellen wurden für einige Wochen bei -70°C belassen und zur Dauerlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

4.7.4.6 Auftauen und Wiederanzucht eingefrorener Hybridoma-Zellen

Die in Plastikampullen tiefgefrorenen Hybridomas wurden rasch in einem 37°C Wasserbad aufgetaut, in ein 9,0 ml Kulturmedium B enthaltendes Zentrifugenröhrchen überführt und pelletiert (10 min, 1000 UpM). Die Zellen resuspendierte ich vorsichtig in 1,0 ml Kulturmedium B und und pipettierte sie in 2 Vertiefungen einer 24-Loch-Multischale. Teilweise erfolgte die Aussaat in verschiedenen Zelldichten von etwa 2×10^5 bzw. 5×10^4 Zellen/ml. Nach 4 bis 5 sowie nach 24 Stunden und an jedem weiteren Tag wurden die Hybridomas mikroskopisch beurteilt und je nach Wachstum und Anteil der lebenden Zellen passagiert. Kulturen, die sich gut entwickelten, reklonierte ich möglichst bald, um zu verhindern, daß mitlerweile nicht mehr produzierende Zellen Antikörper produzierende Hybridomas überwucherten.

4.7.4.7 Produktion von Hybridoma-Überständen in größerem Maßstab

10^6 bis 10^7 Zellen einer mindestens zweimal klonierten Hybridoma-Zellinie wurden in 250 ml-Gewebekulturflaschen (Falcon®) oder 500 ml-Glasflaschen überführt und zunächst mit Kulturmedium B versorgt. Wenn das Wachstum der Zellen es zuließ, reduzierte ich später den Serumgehalt im Medium. Die Hybridomas wurden ohne Mediumwechsel gehalten, es erfolgte lediglich die Zugabe von frischem Medium, bis die Zellen sich in 200 bis 250 ml Kulturüberstand befanden. Dann stellte ich die Zugabe frischen Mediums ein und wartete das Absterben der Zellen ab. Zellen und Detritus wurden durch Zentrifugation (20 min, 2000 UpM; Model PR-2, International Equipment Company, Needham Heights, Mass., USA) abgetrennt und die im Überstand enthaltenen monoklonalen Antikörper gereinigt.

4.7.5 Gewinnung von Aszites-Flüssigkeiten

Balb/c-Mäuse wurden zweimal im Abstand von 14 Tagen durch intraperitoneale Gabe von je 0,5 ml Pristane® (2,6,10,14-Tetramethylpentadekan; Sigma, Taufkirchen) immunsupprimiert. Nach weiteren 10 Tagen erhielten jeweils 2 bis 3 Tiere etwa 10^6 klonierte, Antikörper produzierende Hybridoma-Zellen intraperitoneal verabreicht. Die Zellen waren zuvor zweimal in PBS gewaschen und 10 min bei 1000 UpM (Minifuge, Heraeus Christ) zentrifugiert worden. Die Mäuse untersuchte ich täglich auf Flüssigkeitsansammlung in der Bauchhöhle. Die Produktion von Aszites- Flüssigkeit setzte 3 bis 5 Wochen nach der Applikation der Zellen ein. Durch Punktion der Bauchhöhle wurde das Transsudat gewonnen. Nachdem die Fibrinretraktion erfolgt war, wurde das Punktat 10 min bei 3000 UpM zentrifugiert, der Überstand portioniert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

4.8 Herkunft der monoklonalen Antikörper

Mit Hilfe der in Abschnitt 4.7.3 beschriebenen Techniken produzierte ich monoklonale Antikörper gegen Pseudorabiesvirus. Für weitere Untersuchungen überließ mir Herr Prof. Dr. Pauli dankenswerterweise gegen BHV-2-Oberflächenantigene gerichtete monoklonale Antikörper, die er in Zusammenarbeit mit Frau Jan E. Lewis hergestellt hatte. Gegen HSV gerichtete monoklonale Antikörper erhielt ich von Herrn Prof. Dr. Ludwig. Sie waren freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Roizman, Chicago, und Frau Dr. Pereira, Berkeley, zur Verfügung gestellt worden. Vorläufige Ergebnisse über die Eigenschaften einiger dieser Antikörper sind bereits publiziert (CONRATHS *et al.*, 1985) bzw. wurden beim 10th International Herpesvirus Workshop in Ann Arbour (1985) vorgestellt.

4.9 Reinigung monoklonaler Antikörper

4.9.1 Konzentrieren von Überständen

250 bis 500 ml Hybridoma-Überstand wurden im Eisbad gekühlt und langsam unter ständigem Rühren mit Ammoniumsulfat versetzt, bis eine Konzentration von 315,0 g/l Ammoniumsulfat erreicht war. Nach dem Lösen des Salzes wurde der Überstand weitere 30 min im Eisbad gerührt. Die durch diese Behandlung gefällten Proteine zentrifugierte ich anschließend im GSA-Rotor (Sorvall®, Du Pont de Nemours, Bad Nauheim) 10 min bei 8000 UpM ab und löste sie in einem Zehntel des ursprünglichen Volumens. Als Pufferlösung fand dabei PBS Verwendung. Die Fällung wiederholte ich unter den gleichen Bedingungen mit einer Konzentration von 280 g/l Ammoniumsulfat, das nach erneutem Zentrifugieren (10 min, 8000 UpM; GSA-Rotor, Sorvall®) erhaltene Pellet löste ich in 3 bis 5 ml PBS . Das Konzentrat wurde zweimal mindestens 3 Stunden

und einmal über Nacht gegen PBS dialysiert und 10 min bei 3000 UpM zentrifugiert. Die Lagerung der zuvor portionierten Überstände erfolgte bei -20°C.

4.9.2 Reinigung monoklonaler Antikörper durch Affinitäts-Chromatographie

4.9.2.1 Lösungen

1 M Tris-HCl, pH 8,6; 121,1 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; Aqua dest. ad 1000,0 ml; pH 8,6 mit HCl einstellen.

20 mM Tris-HCl, pH 8,6: 20,0 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,6 ; Aqua dest. ad 1000,0 ml

Phosphatpuffer

0,067 M KH_2PO_4-Lösung: 9,08 g Kaliumdihydrogenphosphat; Aqua dest. ad 1000,00 ml

0,067 M Na_2HPO_4-Lösung: 11,88 g Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat; Aqua dest. ad 1000,00 ml

Phosphat-Puffer, pH 5,5: 95,8 ml 0,067 M KH_2PO_4-Lösung; 4,2 ml 0,067 M Na_2PO_4-Lösung

Citrat-Puffer

0,1 M Dinatriumcitrat-Lösung: 21,0 g Citronensäure-1-hydrat; 200,0 ml 1n Natronlauge ; Aqua dest. ad 1000,0 ml; Citronensäure-1-hydrat in Natronlauge lösen, anschließend mit Aqua dest. auf 1000,0 ml auffüllen.
Citratpuffer: Zur Herstellung von Pufferlösungen mit den pH-Werten 4,0; 3,0 und 2,5 0,1 M Dinatriumcitrat-Lösung mit 0,1 M HCl titrieren.

4.9.2.2 Affinitäts-Chromatographie mit Protein-A-Sepharose CL-4B

Die von GODING (1983) beschriebene Methode fand in modifizierter Form Anwendung. Sepharose CL-4B, an die Protein A aus *Staphylococcus aureus*, Stamm Cowan I, kovalent gebunden war, wurde käuflich erworben (Pharmacia, Freiburg). 1,4 g trockene Sepharose CL-4B wurden zum Quellen mit 20 ml PBS versetzt und über Nacht bei RT auf einem Horizontalschüttler bewegt. Das erhaltene Gel packte ich in eine 10 ml Chromatographiesäule, wusch es mit 15 ml Citratpuffer, pH 2,5, und anschließend mit 30 ml PBS . Die Säule wurde in einer Kühlbox untergebracht und mit 15 ml 20 mM Tris-HCl, pH 8,6, äquilibriert. Zur Reinigung wurden entweder Hybridoma-Kulturüberstände ohne Vorbehandlung oder Konzentrate aus Ammoniumsulfat-gefällten Überständen bzw. Aszitesflüssigkeiten herangezogen. Hybridoma-Überstände brachte ich mit 1 M Tris-HCl, pH 8,6, auf pH 8,6. Konzentrierte Überstände und Aszitesflüssigkeiten pufferte ich durch Dialyse oder mittels einer Sephadex G 25-Molekularsiebsäule (PD 10, Pharmacia, Freiburg) auf 20 mM Tris-HCl, pH 8,6, um und ließ sie mit einer Flußrate von etwa 30 ml/h über die Säule pumpen. Nach der Adsorption der Antikörper an das Protein A-Sepharosegel wurde die Chromatographie-Säule mit ca. 20 ml 20 mM Tris-HCl, pH 8,6, gewaschen, bis die in einem Durchfluß-Spektralphotometer (ISCO, USA) gemessene Absorption von ultravioletttem Licht der Wellenlänge 254 nm auf

den Wert zurückgekehrte, der während der Äquilibrierung vorgelegen hatte. Die Elution von Maus-IgG der Subklasse 1 erfolgte mit Phosphatpuffer, pH 5,5. IgG 2a und 3 ließen sich mit Citratpuffer, pH 4,0, von der Säule trennen, und IgG 2b wurde mit Citratpuffer, pH 3, eluiert. Bei der Reinigung von monoklonalen Antikörpern der IgG-Subklassen 2a, 2b und 3 aus Aszitesflüssigkeiten mußte dieses Verfahren modifiziert werden, um das Mitreinigen des enthaltenen unspezifischen IgG 1, 2a oder 3 zu vermeiden. Zur Isolierung von IgG 2a oder 3 wurde deshalb zunächst das unspezifische IgG 1 durch Elution mit Phosphatpuffer, pH 5,5, abgetrennt, bevor der pH-Wert 4,0 zur Gewinnung von IgG 2a und 3 mit Citratpuffer eingestellt werden konnte. Analog legte ich zur Reinigung von IgG 2b einen Vorhalt bei pH 4,0 ein, um unspezifisches IgG der Subklassen 1, 2a und 3 auszusondern. Zur Schonung der Immunglobuline wurden Eluatfraktionen von ca. 800 µl (16 Tropfen) mit pH-Werten unter 5,5 in Reagenzgläsern aufgefangen, die 200 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,6, als Vorlage enthielten. Die UV-Absorption bei 280 nm der einzelnen Fraktionen bestimmte ich spektralphotometrisch (Modell 260, Gilford, Oberlin, USA) und berechnete ihren Proteingehalt nach folgender Formel:

$$A_{280}\text{Einheiten} : 1{,}25 = \text{mg Protein/ml}$$

Fraktionen, die mehr als 1 mg/ml Protein enthielten, wurden bei -70°C eingefroren oder ebenso wie Eluate, deren Proteingehalt niedriger war, bis zur baldigen Weiterverarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

Das Chromatographiegel reinigte ich nach jedem Trenngang mit 15 ml Citratpuffer, pH 2,5, und äquilibrierte es mit 20 ml Tris-HCl, pH 8,6, dem 0.01 % (w/v) Natriumazid zugesetzt war.

Ein Beispiel für die Reinigung des monoklonalen Antikörpers E23F12 aus Zellkulturüberstand ist in Abbildung 1 dargestellt. Nach dem Äquilibrieren der Protein A-Sepharosesäule ließ ich die in Zellkulturüberstand enthaltenen Antikörper an die Matrix adsorbieren, wusch bis die UV-Absorption auf den

Ausgangswert zurückgekehrt war und eluierte mit Citratpuffer, pH 3,0, einen Protein"peak" mit einer Extinktion (O.D.) von 0,38 am Maximum. Nach kurzem Spülen der Säule mit Citratpuffer, pH 2,5, wurde das Chromatographiegel mit Startpuffer reäquilibriert.

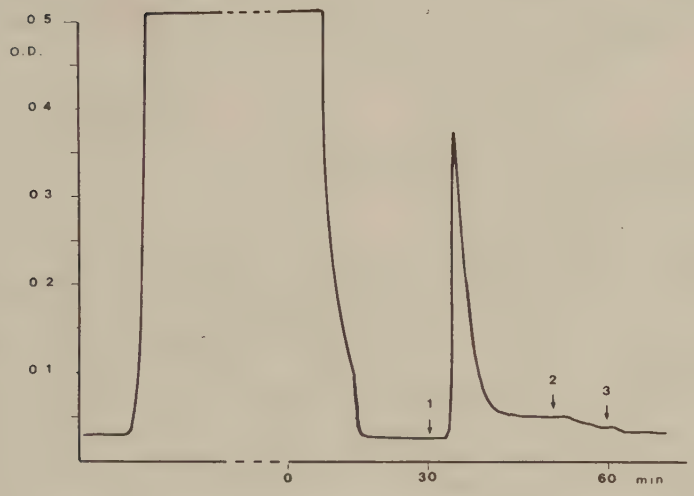


Abb. 1: Reinigung monoklonaler Antikörper mittels Affinitäts-chromatographie an Protein A-Sepharose

250 ml Hybridoma-Zellkulturüberstand des Klons E23F12 wurden an Protein A-Sepharose adsorbiert. Nach Waschen der Säule mit Startpuffer erfolgte die Elution von Antikörpern mit Citratpuffer, pH 3,0 (ab Pfeil 1), Spülen mit Citratpuffer, pH 2,5 (ab Pfeil 2) und das Reäquilibrieren der Säule (ab Pfeil 3).
(_ _ _): Während der Bindung der Antikörper an das Gel wurde die Aufzeichnung der UV-Absorption unterbrochen.

4.9.3 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

4.9.3.1 Lösungen

A-Puffer: 20,0 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,6 (s. 4.7.2.1); Aqua dest. ad 1000,0 ml

B-Puffer: 23,4 g Natriumchlorid; A-Puffer ad 400,0 ml

Beide Puffer-Lösungen entlüften und sterilfiltrieren (Minisart NML, 0,2 µm; Sartorius, Göttingen).

4.7.3.2 Gerätebeschreibung und Trennprinzip

Der Aufbau der FPLC-Apparatur ist in Abbildung 2 skizziert. Zentraler Bestandteil der Anlage war eine Anionen-Austausch-Chromatographiesäule Mono Q (Pharamcia, Freiburg). Die Säule konnte mittels der Hochdruckpumpen A und B mit den korrespondierenden Pufferlösungen A und B beschickt werden. Um den zur Elution benötigten Salzgradienten herzustellen, wurde der Förderanteil der Pumpen von einem Computer (LCC 500; Pharmacia) errechnet, der gleichzeitig die Förderleistung der Pumpen steuerte. Nach Mischen der beiden Pufferlösungen erreichte das Eluens über das Motorventil (MV-8, Pharmacia) und das Handventil (V-1, Pharmacia) die Ionenaustauscher-Säule. Die UV-Absorption des Eluates bei 280 nm wurde in einer Durchflußmeßzelle gemessen und simultan mit dem prozentualen Anteil der geförderten Menge des B-Puffers aufgezeichnet. Bei Bedarf konnten Eluatproben mit einem Fraktionssammler aufgefangen werden. Das Motorventil ermöglichte mit seinen drei Schaltstellungen das Beschicken der Probenschleife, das Auftragen der Probe auf die Säule und ein Waschprogramm zum Wechsel des Puffersystems, bei dem die Chromatographiesäule wegen des hohen Druckes, mit dem der Vorgang erfolgte, aus dem Pufferstrom ausgeschlossen wurde. Es ließ sich

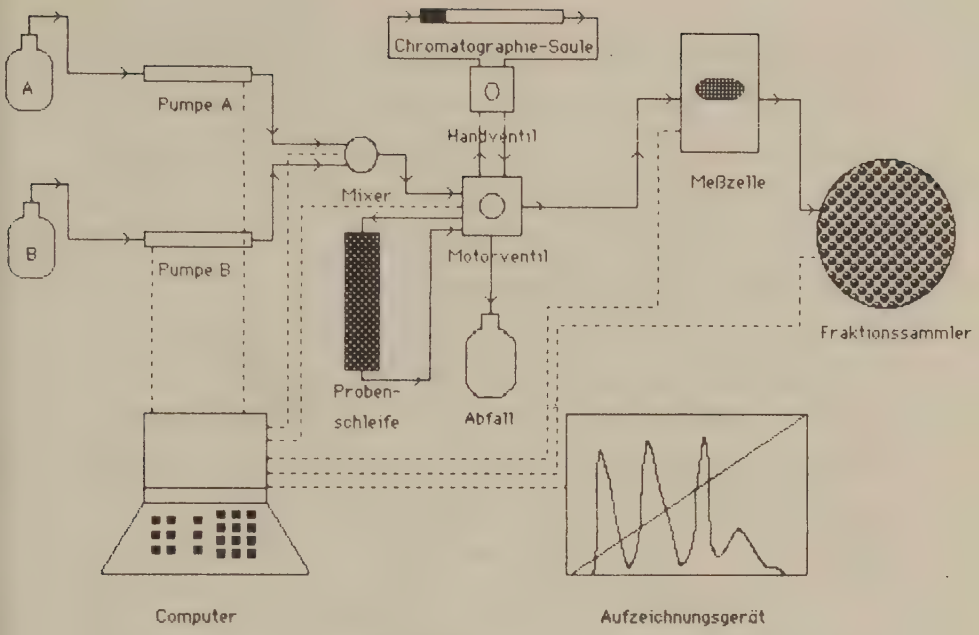


Abb. 2: Schema zur Anordnung der FPLC-Apparatur

——— Schlauchverbindungen

------ Computersteuerung

neben den Pumpen, dem Aufzeichnungsgerät und dem Fraktionssammler vom Computer aus bedienen. Durch Umkehren der Flußrichtung mit dem Handventil konnten Verunreinigungen, die sich auf der Eingangsseite der Chromatographiesäule abgelagert hatten, zurückgespült werden.

4.9.3.3 FPLC-Reinigung monoklonaler Antikörper

0,5 bis 1,0 mg affinitätschromatographisch gereinigte monoklonale Antikörper wurden auf 20 mM Tris-HCl, pH 8,6 umgepuffert. Danach erfolgte ein Probelauf ohne Einsatz von Antikörpern unter den Bedingungen des späteren Trenngangs.

Anschließend wurde die Säule mit etwa 10 ml A-Puffer bei einer Flußrate von 2,0 ml/min äquilibriert und das zu trennende Proteingemisch in die Probenschleife verbracht. Die folgenden Schritte löste ich über ein zuvor erstelltes Computerprogramm aus. Zunächst erfolgte das Auftragen der Probe auf die Chromatographiesäule, gefolgt von einem kurzen Spülen mit Startpuffer. Eluiert wurde mit einem Gradienten, der im Laufe von 20,0 ml kontinuierlich auf eine Kochsalz-Konzentration von 0,4 M anstieg, um nach weiteren 2,0 ml 1,0 M NaCl zu erreichen. Nach Durchfluß von 2,0 ml B-Puffer fiel die Kochsalz-Konzentration innerhalb von 2,0 ml kontinuierlich auf den Nullwert ab. Abschließend wurde die Säule mit 5,0 ml Startpuffer äquilibriert. Durchlauf und Eluat wurden in Fraktionen von je 1,0 ml gesammelt und bis zum Test auf spezifischen Antikörpergehalt bei 4°C aufbewahrt. Der Trenngang fand bei RT statt. Abschließend wurde die Aktivität der gereinigten Antikörper im ELISA überprüft. Mittels Affinitäts- und Ionenaustausch-Chromatographie gereinigte Antikörper wurden zur Markierung mit Biotin herangezogen und bei weiteren Versuchsvorhaben des Instituts eingesetzt. Ein Beispiel für die Reinigung von 1 ml konzentrierten Überstands des monoklonalen Antikörpers E23F12 mittels FPLC ist in Abbildung 3 wiedergegeben. Die Aufzeichnung der UV-Absorption erbrachte mehrere kleine und drei größere "peaks", die eine Extinktion (O.D.) von 0,2 überschritten. Der erste von ihnen beinhaltete Material, das nicht an die Anionenaustauschersäule gebunden hatte, der dritte mit einem Scheitelpunkt bei 1,82 O.D. repräsentierte den gereinigten monoklonalen Antikörper. Alle eingesetzten Antikörper ließen sich im Bereich von 160 bis 220 mM NaCl eluieren.

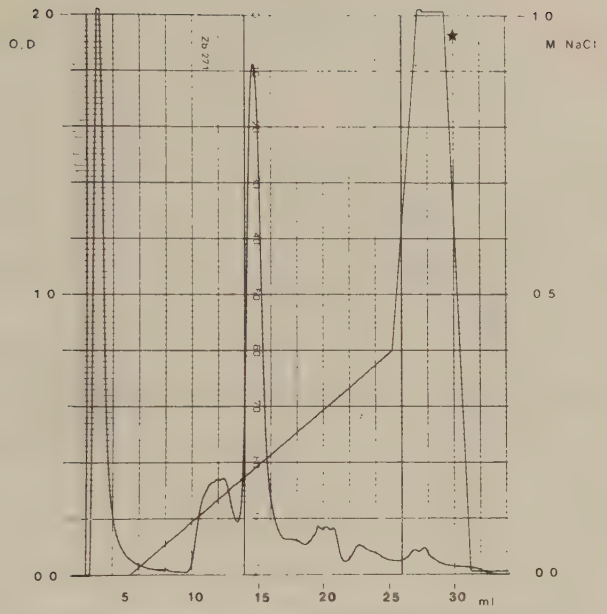


Abb. 3: Reinigung monoklonaler Antikörper mittels FPLC

Die in 1,0 ml konzentriertem Überstand (E23F12) enthaltenen Proteine wurden an eine Anionenaustauschersäule adsorbiert und die gebundenen Polypeptide mit einem NaCl-Gradienten eluiert. Die Graphen der Abbildung geben die fortlaufende Aufzeichnung von UV-Absorption und NaCl-Konzentration (*) wieder.

4.9.4 Biotin-Markierung monoklonaler Antikörper nach GODING (1983)

4.9.4.1 Lösungen

Kopplungspuffer: Natriumhydrogencarbonat 8,40 g; Aqua dest. ad 1000,0 ml; pH mit NaOH auf 9,1 einstellen.

4.9.4.2 Markierung

Mittels Affinitäts- und Ionenaustausch-Chromatographie gereinigte monoklonale Antikörper wurden zweimal 3 h und einmal über Nacht bei 4°C gegen jeweils frischen Kopplungspuffer dialysiert, der Proteingehalt der Proben bestimmt (LOWRY *et al.*, 1951) und auf 1,0 mg/ml eingestellt. Unmittelbar vor Gebrauch erfolgte die Herstellung einer Lösung von 1,0 g N-Hydroxysuccinimido-Biotin (Sigma) pro Milliliter Dimethylsulfoxid (DMSO), die zu gleichen Volumenteilen mit der antikörperhaltigen Lösung gemischt und 4 h bei RT inkubiert wurde. Eine ausgiebige Dialyse gegen PBS und die Kontrolle des Kopplungsergebnisses im ELISA schlossen das Markierungsverfahren ab.

4.10 Methoden zur Charakterisierung monoklonaler Antikörper

4.10.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

4.10.1.1 Lösungen, Chemikalien

1 % (w/v) Triton X-100 Lösung: 10 g Triton X-100; PBS ad 1000,0 ml

Waschlösung: 1,0 ml FKS; PBS ad 100,0 ml

50 mM Azetatpuffer, pH 5,3 (Azetatpuffer): 1,2 ml Essigsäure (Eisessig 96 % mind.); Aqua dest. ad 1000,0 ml; pH 5,3 mit 1 M NaOH einstellen.

4.10.1.2 Herstellung von Antigen-gekoppelten Microtiterplatten

Einen auf der Erkennung virusspezifischen Antigens in Plaques beruhenden Zell-ELISA modifizierte ich zur Anwendung bei SHV-1 (PAULI *et al.*, 1984). So wurden etwa 2 $x10^4$ ML-Zellen in die Vertiefungen von Microtiterplatten ausgesät und mit 30 PBE pro Kavität infiziert. Nach Ausbildung mikroskopisch sichtbarer Plaques erfolgte die Fixierung. Ich testete verschiedene Fixiermethoden und modifizierte sie, bis das Ergebnis befriedigte. Dabei fanden Lösungen mit unterschiedlichem Gehalt an Formaldehyd, Paraformaldehyd, Glutardialdehyd, Methanol, Aceton und Pikrinsäure Verwendung. Die Stoffe wurden teils einzeln, teils gemischt in destilliertem Wasser oder PBS gelöst. Schließlich fand eine 3 % Formaldehyd-Lösung in PBS Verwendung, wenn Antigene im Inneren infizierter Zellen untersucht werden sollten. Interessierten Zelloberflächen-Epitope, benutzte ich eine 0,25 % (v/v) Glutardialdehyd-Lösung (Roth, Karlsruhe). Die Kulturen wurden unter dem jeweiligen Fixativ bei 4°C in Plastikfolie verpackt aufbewahrt und waren mindestens 3 Monate lagerfähig.

Analog zum beschriebenen Verfahren stellte ich Testplatten mit BHV-1 (B_1), BHV-2 (BMV); BHV-2 (TVA), EHV-1(Army 183), HSV-1 (F) und HSV-2 (G) her.

4.10.1.3 Nachweis von Antikörpern im ELISA

Nach dem Entfernen des Fixiermittels wurden die zum Nachweis intrazellulären Antigens vorgesehenen Zellen mit ca. 200 µl 1 % Triton X-100-Lösung aufgeschlossen (30 min, 37°C). Zur Detektion von Oberflächenantigenen verwendete ich mit Glutardialdehyd fixierte Zellkulturen, die 30 min bei RT mit 200 µl 10 mM Ethanolamin-Lösung behandelt worden waren, um noch freie Valenzen des Dialdehyds abzusättigen.

Anschließend spülte ich die Platten mit 200 µl Waschlösung, füllte sie erneut auf und inkubierte sie 30 min bei 37°C. Das in der Waschflüssigkeit enthaltene FKS diente zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen für Antikörper und andere Proteine.

Kulturüberstände von Hybridomas, Konzentrate monoklonaler Antikörper oder Seren wurden gegebenenfalls in geeigneter Verdünung in die Vertiefungen der Testplatten überführt. Zur Quantifizierung des Antikörpergehalts konzentrierter Hybridoma-Überstände oder Seren legte ich logarithmische Verdünnungsreihen zur Basis 2 an, aus denen ich dann Aliquots in die Kavitäten der Antigenträgerplatte übertrug. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 30 min bei 37°C, nach der die Testansätze dreimal gewaschen wurden, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach gab ich Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes IgG zu, das gegen schwere und leichte Immunglobulinketten der entsprechenden Spezies gerichtet war. Die im Handel erhältlichen peroxidasemarkierten Anti-IgG-Antikörper (Konjugate; Nordic, Bochum; Paesel, Frankfurt) trug ich in geeigneter Verdünnung mit Waschlösung unter Zusatz von 10 % normalem Kaninchenserum auf die Testplatte auf und inkubierte die Ansätze 30 min bei 37°C. Überschüssiges Konjugat wurde durch fünfmaliges Waschen entfernt, danach ließen sich Antigen-Antikörper-Konjugat-Komplexe durch Zugabe von Substrat nachweisen. Zur Herstellung der Substratlösung wurden 10 mg 3-Amino-9-ethyl-carbazol (Sigma) in 5 ml Dimethylsulfoxid gelöst und zu 50 ml Azetatpuffer gegeben. Die Lösung bereitete ich unmittelbar vor dem Auftragen zu und ergänzte sie mit 100 µl 3% Wasserstoffperoxid. Jede Vertiefung der Microtiterplatten erhielt 50 µl Substratlösung. Nach 15 - 30 min Inkubation im Dunkeln wurde die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt. Wegen der möglichen Kanzerogenität von 3-Amino-9-ethyl-carbazol wurden alle Lösungen, die den Wirkstoff enthielten, mit 1 % Natrium-Hypochlorit-Lösung inaktiviert.

Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain®, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA), teils in Kombination mit biotinylierten Konjugaten, setzte

ich ein, um die Empfindlichkeit des ELISA zu erhöhen oder um direkt mit Biotin markierte monoklonale Antikörper nachzuweisen. Das angewandte Verfahren entsprach in den Grundzügen der zuvor beschriebenen Technik, lediglich der Nachweis der Antigen-Antikörper-Komplexe war modifiziert. Anstelle von Anti-IgG-Peroxidase-Konjugaten wurden die Testansätze bei indirektem Nachweis von Maus-Immunglobulinen mit einem Biotin-markierten Anti-Spezies-IgG 60 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Zugabe des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes. Die weitere Behandlung lief wie beim einfachen ELISA ab.

4.10.3 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)

4.10.3.1 Lösungen

3 % Formaldehyd in PBS: 12,3 ml 37 % Formaldehyd, PBS. ad 100,0 ml

Waschlösung: (s. 4.10.2.1)

Einbettungsflüssigkeit: 5,0 ml Glycerin ; 5,0 ml PBS

4.10.3.2 Herstellung der mit infizierten Zellen beschichteten Deckgläschen

2 x 10^5 Vero-Zellen wurden in die Vertiefungen von 24-Loch-Multischalen (NUNC) ausgesät, die zuvor mit Deckgläschen beschickt worden waren. Die mit 80 - 100 PBE infizierten Kulturen wurden nach der Adsorption mit CMC-Overlaymedium überschichtet (s. 4.4.1) und nach Ausbildung mikroskopisch erkennbarer Plaques mit 3 % Formaldehyd in PBS 30 min bei RT fixiert und unter dem Fixativ bis zum Gebrauch bei 4°C dunkel aufbewahrt.

4.10.3.3 Durchführung des IFT

Zur Aufdeckung von Antigenen im Inneren infizierter Zellen inkubierte ich die Deckgläschen mit 200 µl 1 % Triton X-100-Lösung in PBS (s. 4.10.1.1) 30 min bei 37°C. Bei Zellen, deren Oberflächenantigene untersucht werden sollten, unterblieb der Detergenz-Aufschluß. Anschließend erfolgte eine Behandlung der Deckgläschen mit Waschflüssigkeit (30 min, 37°C), die dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen diente. Danach wurden Seren bzw. monoklonale Antikörper aufgetragen und 60 min bei RT auf den Testansätzen belassen. Nach dem Entfernen überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen trug ich Fluorescein-Isothiocyanat-konjugiertes anti-Maus-IgG in geeigneter Verdünnung auf. Nach 60 min Inkubation bei RT und weiteren drei Waschschritten erfolgte die Einbettung mit 50 % (v/v) Glycerin in PBS auf Objektträgern und die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung.

4.10.4 Neutralisationstest

Die im Rahmen dieser Untersuchungen benutzte Technik zur Bestimmung der virusneutralisierenden Eigenschaften von Seren und monoklonalen Antikörpern ist eine auf dem Plaquetest beruhende Plaquereduktionsmethode, die mit variierter Antikörpermenge bei konstantem Einsatz an Virus durchgeführt wurde (PAULI u. LUDWIG, 1977).

4.10.4.1 Neutralisationstest in Abwesenheit von Komplement

In Seren oder monoklonale Antikörper enthaltenden Aszites-Flüssigkeiten eventuell vorhandenes Komplement wurde inaktiviert (30 min, 56°C). Anschließend stellte ich Verdünnungsreihen logarithmisch zur Basis 2 als

Doppelansätze in 24-Loch-Multischalen (NUNC) her. Nach Zugabe von 80 PBE pro Ansatz und einer 60 min-Inkubation des Gemisches bei 37°C wurden pro Kavität 2×10^4 Zellen zugegeben und die Inkubation 4 h bei 37°C fortgesetzt. Die weitere Behandlung von der Zugabe des CMC-haltigen Overlaymediums bis zum Auszählen der Plaques gleicht dem Vorgehen beim Plaquetest (s. 4.4.2). In Kontrollansätzen, die keine neutralisierenden Antikörper enthielten, erfolgte die Bestimmung der effektiv eingesetzten plaquebildenden Einheiten. Die Mittelwerte der Plaquezahlen in den Kontrollkulturen wurden berechnet und als V_0 bezeichnet. Die in den Testansätzen entstandenen Plaques wurden ebenfalls ausgezählt, die Mittelwerte (bezeichnet als V) berechnet und die jeweiligen Quotienten $V:V_0$ gebildet. Die errechneten Daten trug ich gegen die Werte der Verdünnungsreihe auf halblogarithmischem Papier auf, wobei die Darstellung der Verdünnungsstufen auf der Abszisse erfolgte. Die aus einer Serumverdünnungsreihe erhaltenen Punkte ergaben eine Regressionsgerade, die das Ablesen der Antikörperverdünnung erlaubte, die 50 % Plaquereduktion bewirkt hatte. Die in der Arbeit angegebenen Neutralisationstiter beziehen sich grundsätzlich auf 50 % Plaquereduktion. Beispiele für die graphische Ermittlung der Neutralisationstiter gibt die Abbildung 4.

4.10.4.2 Neutralisationstest in Gegenwart von Komplement

Antikörperhaltige Flüssigkeiten verdünnte ich zunächst wie beschrieben, versetzte sie mit Virus und inkubierte sie 30 min bei 37°C. Nach der Zugabe von Kaninchenkomplement (Behringwerke, Marburg) wurde die Inkubation 30 min bei 37°C fortgesetzt. In Kontrollansätzen erfolgte die Zugabe von hitzeinaktiviertem (30 min, 56°C) Komplement. Die eingesetzten Chargen waren in Vorversuchen auf neutralisierende Antikörper gegen die entsprechenden Viren untersucht und ihre optimale Konzentration in

Schachbrett-Titrationen mit definierten Seren aus der Institutssammlung ermittelt worden.

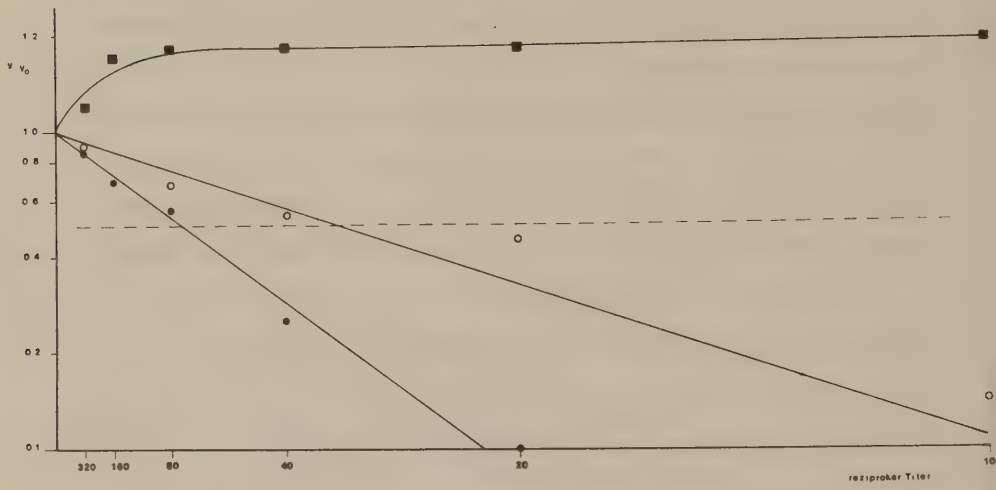


Abb. 4: Ermittlung des Neutralisationstiters monoklonaler Antikörper gegenüber BHV-2

Der Quotient $V:V_0$ (Verhältnis ausgezählte Plaques zu Plaques in Viruskontrolle) wurde gegen die reziproke Antikörperverdünnung aufgetragen. Die Regressionsgerade erlaubt die Berechnung der Titer bei 50 % Plaquereduktion.

(●): Antikörper C2D8; Titer: 1:75 bei 50 % Plaquereduktion
(○): Antikörper E1D3; Titer: 1:32 " " " "
(■): Antikörper E23F12; Erhöhung der Infektiosität bei geringer Verdünnung des Antikörpers

4.10.5 Test auf Penetrationshemmung

2 x 10^5 Vero-Zellen wurden in die Vertiefungen von 24-Loch-Multischalen ausgesät. Nachdem über Nacht ein konfluenter Zellrasen entstanden war, kühlte ich die Kulturschalen auf 4°C ab und infizierte die Zellen mit 80 PBE pro Kavität. Bei der folgenden Inkubation (2 h, 4°C) wurde dem Virus zwar die Adsorption, nicht aber die Penetration gestattet (FULLER u. SPEAR, 1985). Nach der Zugabe von logarithmisch zur Basis 2 verdünnten Antikörpern erfolgte die weitere Inkubation bei 37°C. Nach 4 h wurde CMC-Overlaymedium zugefügt und die Inkubation bei 37°C fortgesetzt, bis makroskopisch auswertbare Plaques entstanden waren.

4.10.6 Test auf Fusionshemmung

In 24-Loch-Kulturgefäßen konfluent gewachsene Vero-Zellen wurden mit 80 PBE BHV-2 eine Stunde bei 37°C inkubiert. Eine Stunde p.i. gab ich logarithmisch zur Basis 2 verdünnte monoklonale Antikörper zu und setzte die Inkubation bis zur Ausbildung mikroskopisch auswertbarer Plaques fort.

4.10.7 Indirekte Immunpräzipitation

4.10.7.1 Herstellung von Antigenpräparationen aus infizierten Zellen

4.10.7.1.1 Lösungen

RSB-Puffer: 0,6 g NaCl; 0,3 g $MgCl_2$; 10,0 ml 1 M Tris HCl, pH 7,4; Aqua dest. ad 1000,0 ml

10 % (w/v) Saccharose in PBS: 20,0 g Saccharose; PBS ad 100,0 ml.

20 % (w/v) Natrium-Dodecylsulfat (SDS): 20 g Natrium-Dodecylsulfat (Serva, Heidelberg); Aqua dest. ad 100,0 ml; bei RT lagern.

Lysispuffer B: 34 mg N-α-p-Tosyl-L-lysin-chloromethyl-keton (TLCK, Sigma); 34 mg N-Tosyl-L-phenylalanin-chloromethyl-keton (TPCK, Sigma); 17 mg Phenylmethyl-sulfonylfluorid (PMSF, Sigma); Lysispuffer A (s. 4.8.1.1) ad 100,0 ml

Lysispuffer C: nach dem Lysieren von Zellen in Lysispuffer B 10 % Natriumdesoxycholat (DOC, s. 4.8.1.1) bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % zugeben.

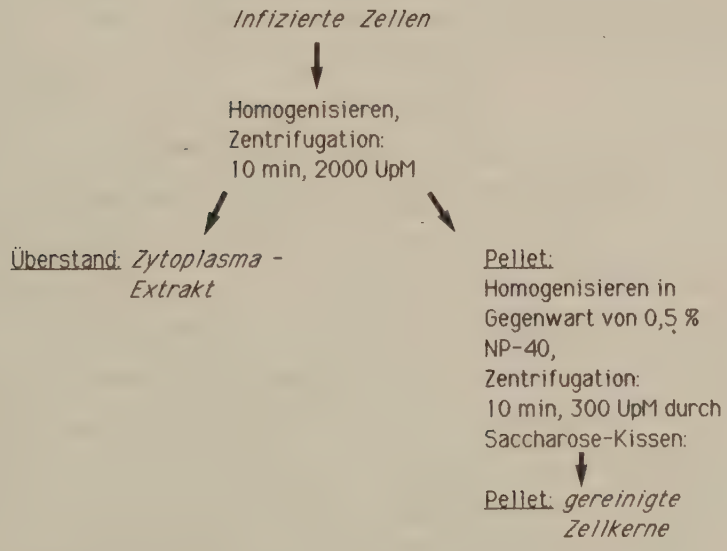
Lysispuffer D: 5,0 ml 20 % SDS; Lysispuffer B ad 100,0 ml

4.10.7.1.2 Herstellung der Antigenpräparationen

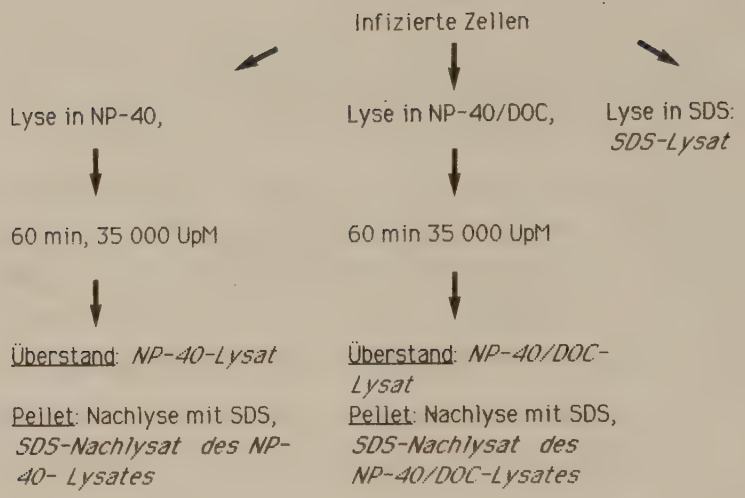
Mit hoher Infektionsmultiplizität infizierte Monolayer wurden nach Ausbildung eines fortgeschrittenen zytopathischen Effektes geerntet, abzentrifugiert (10 min, 3000 UpM, Minifuge) und ihr Feuchtgewicht ermittelt. Ich setzte die Zellen nach Suspendieren in PBS entweder direkt in Immunpräzipitationen ein, um Oberflächenantigene nachzuweisen, solubilisierte sie mit Hilfe von Detergentien oder isolierte Zellkerne und Zytoplasma (s. Fließschemata 1 und 2).

Zur Reinigung der Kerne infizierter Zellen nahm ich den frisch geernteten Monolayer einer Gewebekulturschale von 10 cm Ø in 2,0 ml RSB auf, inkubierte die Suspension 10 min im Eisbad und homogenisierte sie (10 Kolbenhübe, Homogenisator S, Braun, Melsungen). Das Homogenat wurde 10 min bei 2000

UpM zentrifugiert (Minifuge, Heraeus Christ, Osterode), der Überstand abgehoben, portioniert und als Zytoplasma-Extrakt weiterverwendet. Nachdem ich das Pellet erneut in 2,0 ml RSB aufgenommen hatte, gab ich 10 % NP-40 bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % zu, wiederholte das Homogenisieren und schichtete die Suspension über ein 2,0 ml umfasssendes Kissen aus 20 % (w/v) Saccharose in PBS. Nach 10 min Zentrifugieren bei 300 UpM (Minifuge) enthielt das Pellet die gewünschten Zellkerne, die nach vorsichtigem Dekantieren des Überstands in PBS , Lysispuffer C oder D suspendiert bzw. gelöst wurden (s. Fließschema 1).



Fließschema 1: Isolation von Zellkernen und Gewinnung von Zytoplasma-Extrakt



Fließschema 2: Herstellung von Lysaten infizierter Zellen

Die Lyse infizierter Zellen nahm ich durch Herstellung einer 20 % (w/v) Suspension in Lysispuffer B oder C, oder einer 70 % (w/v) Suspension in Lysispuffer D (SDS-Lysate) vor. Suspensionen in Lysispuffer B (NP-40-Lysate) und C (NP-40/DOC-Lysate) wurden 60 min bei 35 000 UpM ultrazentrifugiert (SW 50.1, Beckmann), der Überstand abgenommen, portioniert und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert. Die Pellets wurden mit 100 µl Lysispuffer D nachlysiert und ebenfalls tiefgefroren (s. Fließschema 2).

Radioaktiv markierte Zellen wurden in Lysispuffer C aufgenommen und weiterbehandelt wie unmarkierte NP-40/DOC-Lysate. Die Bestimmung der Radioaktivität in 5 µl Aliquots, die in 10 ml READYSOLVE EP® gelöst worden waren, erfolgte mittels eines ß-Szintillationszählers. Solche Antigenpräparationen setzte ich teils bei indirekten Immunpräzipitationen, teils bei einer direkten Analyse in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ein.

4.10.7.1.3 Indirekte Immunpräzipitation

Die in ihren Grundzügen bekannte Technik (GERLOFF et al., 1962; PAULI u. LUDWIG, 1977) modifizierte ich folgendermaßen: 50 µl Mausserum oder 2 bis 20 µl monoklonale Antikörper wurden mit 50 µl Ziege-anti-Maus-IgG gekoppelten Agarosekügelchen ("beads", Sigma) 3 h bei RT unter mehrfachem Aufschütteln bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der "beads" in 200 µl PBS und der Zugabe von 50 µl Antigenpräparation (Lysat) folgte eine Inkubation von 3 h bei RT unter gelegentlichem Schütteln. Wenn SDS-Lysate für Immunpräzipitationen verwendet wurden, war es notwendig, den SDS-Gehalt durch Verdünnen auf 0,1 % abzusenken.
Die Agarosekügelchen mit den daran haftenden Antigen-Antikörper-Komplexen wurden abzentrifugiert (2 min, 8000 UpM, Select-a-Fuge, Biodynamics Inc., Irvine, Kalifornien, USA), zweimal in eiskaltem Lysispuffer B und einmal in ebenfalls eiskaltem destillierten Wasser gewaschen, wodurch unspezifisch gebundene Proteine entfernt werden sollten. Anschließend wurden die Proteine nach Zugabe von 20 µl Probenpuffer (s. 4.10.8.1) 3 min im kochenden Wasserbad denaturiert, die Agarose abzentrifugiert und der Überstand auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen

4.10.8 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Immunpräzipitate, Zellysate und Präparationen aus gereinigten Viren bzw. Kapsiden analysierte ich in diskontinuierlichen Polyacrylamid-Flachgelen nach der von LÄMMLI (1970) beschriebenen Methode.

4.10.8.1 Lösungen und Reagenzien

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung: 30,0 g Acrylamid; 0,8 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid (BIS, Roth, Karlsruhe) ; Aqua dest. ad 100,0 ml; bei 4°C lagern.

Trenngelpuffer, pH 8,8: 45,5 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; Aqua dest. ad 500,0 ml; pH 8,8 mit HCl einstellen, bei 4°C lagern.

Sammelgelpuffer, pH 6,8: 38,0 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; Aqua dest. ad 500,0 ml; pH 6,8 mit HCl einstellen, bei 4°C lagern.

20 % (w/v) SDS: (s. 4.10.7.1.1)

10 % (v/v) TEMED: 1,0 ml N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (Serva, Heidelberg); Aqua dest. ad 10,0 ml; bei 4°C lagern.

10 % (w/v) Ammoniumpersulfat: 100 mg Ammoniumpersulfat (Serva), Aqua dest. ad 1,0 ml; unmittelbar vor Gebrauch ansetzen.

Elektrodenpuffer, Stammlösung 4-fach konzentriert: 24,0 g Tris(hydroxy-methyl)aminomethan; 115,2 g Glycin; Aqua dest. ad 2000,0 ml

Elektrodenpuffer, Gebrauchslösung: 250,0 ml Stammlösung; 5,0 ml 20 % SDS ; Aqua dest. ad 1000,0 ml

Probenpuffer, 5-fach konzentriert: 0,5 ml Sammelgelpuffer, pH 6,8; 0,5 ml 2-Mercaptoethanol; 0,5 ml 20 % SDS; 0,5 ml Glycerin; wenige Kristalle Bromphenolblau

Probenpuffer, 2-fach konzentriert: 2,0 ml Probenpuffer, 5-fach; 3,0 ml Aqua

dest.

Färbelösung: 0,48 g Coomassie Brilliant Blau (R-250); 50,0 ml Methanol, konzentriert; 100,0 ml Essigsäure (Eisessig 96 % mind.); Aqua dest. ad 1000,0 ml

Entfärbelösung: 50,0 ml Methanol, konzentriert; 75,0 ml Essigsäure (Eisessig 96 % mind.); Aqua dest. ad 1000,0 ml

4.10.8.2 Herstellung der Polyacrylamidgele

Drei Abstandhalter (Spacer) von 1,5 mm Dicke wurden an den schmalen Seiten und unten mit Hilfe großer Büroklammern zwischen Glasplatten eingeklemmt. Die so erstellte Gelkammer dichtete ich mit 1 % (w/v) heißer Agaroselösung ab und richtete sie horizontal aus. Folgende Lösungen wurden für Gradientengele im Eisbad vorbereitet:

	5 %	12 %
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	2,5 ml	6,0 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml
20 % SDS	0,075 ml	0,075 ml
TEMED, 10 %	0,075 ml	0,075 ml
Aqua dest.	5,0 ml	1,5 ml

Nach dem Entlüften der Lösungen pipettierte ich 9,5 ml jeder Lösung in die Kammern eines Gradientenmischers, gab pro Kammer 105 µl 10 % Ammoniumpersulfat zu und beförderte das Gemisch mittels einer Schlauchpumpe in die Gelkammer.
Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 8,5 % wurden mit folgender Lösung hergestellt:

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	5,7 ml
Trenngelpuffer, pH 8,8	10,0 ml
20 % SDS	0,100 ml
TEMED, 10 %	0,100 ml
Aqua dest.	3,3 ml

Zu der entlüfteten Lösung wurden 210 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat pipettiert und 19,0 ml des Ansatzes in die Gelkammer gefüllt.
Die Oberfläche der Acrylamid enthaltenden Flüssigkeit ließ sich durch Überschichten mit ca. 3 ml wassergesättigtem Butanol glätten. Nachdem die Polymerisation des Trenngels abgeschlossen war, setzte ich die Lösung für das Sammelgel an. Dabei diente Pyronin G dem besseren Sichtbarmachen der Probenkammern.

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	0,5 ml
Sammelgepuffer, pH 6,6	3,0 ml
20 % SDS	0,030 ml
TEMED, 10 %	0,050 ml
Pyronin G, 0,1 % (Bayer AG, Leverkusen)	0,010 ml
Ammoniumpersulfat, 10 %	0,050 ml
Aqua dest.	2,5 ml

Nach dem Entfernen des Butanol vom Trenngel wurde ein Probenkammerspacer in die Gelkammer eingehängt und das Sammelgel einpipettiert. Das Polymerisieren des Sammelgels mußte abgewartet werden, bevor das Gel in die Trennkammer eingesetzt, die Pufferreservoirs gefüllt und der Probenkammer- sowie der Bodenspacer entfernt werden konnten.

4.10.8.3 Molekulargewichts-Standards

Zur Bestimmung der relativen Molekulargewichte separierter Proteine wurden in jedem Elektrophoreselauf Markerproteine mitgeführt. Ich verwendete folgende nicht radioaktiv markierte Proteine (Sigma):

Myosin (Kaninchen-Muskel)	205,0 K (1 K ≙ 10^3 g/mol)
ß-Galaktosidase *(Escherichia coli)*	116,0 K
Phosphorylase B (Kaninchenmuskel)	97,4 K
Albumin (bovines Plasma)	67,0 K
Albumin (Ovalbumin)	45,0 K
Carboanhydrase (Rinder-Erythrozyten)	29,0 K

Die ^{14}C-markierten Markerproteingemische (New England Nuclear, Dreieich) hatten folgende Zusammensetzung:

Myosin (Kaninchenmuskel)	205,0 K
Phosphorylase A (Kaninchenmuskel)	94,0 K
Albumin (bovines Plasma)	67,0 K
Albumin (Ovalbumin)	45,0 K
Lactoglobulin B (Rindermilch)	18,4 K

4.10.8.4 Vorbereitung der Proben und Elektrophoreseablauf

Für die SDS-PAGE-Analyse vorgesehene Proben wurden unmittelbar vor dem Auftragen auf ein Gel je nach Volumen mit 5-fach oder 2-fach konzentriertem Probenpuffer versetzt und 3 min in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Auftragen der Proben und Markerproteingemische erfolgte der Trenngang bei 60 mA Stromstärke und 120 bis 300 V Spannung. Ich beendete den Elektrophoreselauf, wenn die Bromphenolblaufront den unteren Gelrand erreicht hatte.

4.10.8.5 Färben und Entfärben

Zum Anfärben der aufgetrennten Proteine wurden die Gele 20 bis 30 min in Färbelösung geschwenkt und anschließend zur Elution überschüssigen Farbstoffs mehrere Stunden in Entfärbelösung bewegt. Die Färbemethode benutzte ich ebenfalls, um den Erfolg des Elektrotransfers SDS-PAGE-separierter Proteine auf Cellulosenitrat (s. 4.10.9.1) zu kontrollieren.

4.10.8.6 Fluorographie

Gele, in denen radioaktiv markierte Proben aufgetrennt worden waren, wurden in etwa 200 ml EN^{3}HANCE® (New England Nuclear) eine Stunde bewegt, kurz gewässert, durch 90 min Hitzebehandlung unter Vakuum mittels eines "slab gel dryer" (BIO-RAD Laboratories) auf Filterpapier aufgetrocknet und zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat RP film; Kodak, Rochester N.Y., USA) 5 bis 20 Tage bei -70°C in einer Röntgenkassette exponiert.

4.10.8.7 Silberfärbung

4.10.8.7.1 Lösungen, Reagenzien

Lösung A: 100,0 ml Methanol, konzentriert; 15,0 ml Essigsäure (Eisessig, 96 % mind.); Aqua dest. ad 200,0 ml

Lösung B: 10,0 ml Methanol, konzentriert; 15,0 ml Essigsäure (Eisessig, 96 % mind.) ; Aqua dest. ad 200,0 ml

Fixierbad: 20,0 ml Glutardialdehyd (25 %ige Lösung in Wasser); Aqua dest. ad

100,0 ml

Ammoniakalische Silberlösung: 0,8 g Silbernitrat (Sigma) in 1,4 ml Ammoniaklösung (etwa 33 %) lösen, unter Rühren 2,0 ml 1 M NaOH zugeben, mit Aqua dest. auf 100,0 ml auffüllen

Entwickler: 0,2 ml 5 % Citronensäure, 0,1 ml 37 % Formaldehyd, Aqua dest. ad 200,0 ml

4.10.8.7.2 Färbung

Als empfindliche Färbemethode fand das von OAKLEY *et al.* (1980) publizierte Verfahren Verwendung. Polyacrylamidgele wurden über Nacht in 200 ml Lösung A, daran anschließend 30 min im gleichen Volumen Lösung B bewegt. Nach 30 min Schwenken im Fixierbad und ausgiebigem Wässern (2 h bei mindestens dreimaligem Wechsel der Waschflüssigkeit) erfolgte die Zugabe von frisch angesetzter ammoniakalischer Silberlösung, in der das Gel 15 min verblieb. Nach zweimal 2 min Spülen in destilliertem Wasser gab ich Entwickler zu und stoppte die Reaktion nach Erreichen der gewünschten Farbintensität durch Überführen in Lösung A.

4.10.9 Immunoblot

4.10.9.1 Elektrotransfer

4.10.9.1.1 Lösungen

Tris-Glycin-Puffer: 60,6 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 281,6 g Glycin;

Aqua dest. ad 5000,0 ml

Elektrotransfer-Puffer: 600,0 ml Tris-Glycin-Puffer; 600,0 ml Methanol, konzentriert; Aqua dest. ad 3000,0 ml

Amidoschwarz-Färbelösung: 3,03 g Amidoschwarz; 250,0 ml Methanol, konzentriert; 50,0 ml Essigsäure (Eisessig 96 % mind.); 250,0 ml Aqua dest.

4.10.9.1.2 Elektrotransfer

Die von BURNETTE (1981) publizierte Methode des sogenannten "Westernblot" fand Verwendung. Unmittelbar nach Beendigung des Elektrophoreselaufs entnahm ich die Polyacrylmidgele aus der Kammer und benetzte sie mit Elektrotransferpuffer. Ein ebenfalls mit Puffer befeuchtetes Cellulosenitratblatt (CN-Blatt; Schleicher & Schuell, BA 83, Porengröße 0,2 µm) wurde luftblasenfrei auf ein Gel aufgelegt, CN-Blatt und Gel auf der noch freien Seite mit befeuchtetem Filterpapier abgedeckt und zwischen zwei Scotch-brit®-Schwämmen in einer Plastikhalterung in die Transferkammer (BIO-RAD Laboratories) eingesetzt. Die Elektroden schloß ich so an, daß das Polyacrylamidgel kathodenseitig und die CN-Membran anodenwärts lag. Der Transfer erfolgte bei 0,1 A und 30 V über Nacht.

Nach Beendigung des Westernblots wurden die Bahnen, die Molekulargewichtsmarker enthielten, abgeschnitten und durch Eintauchen in Amidoschwarzlösung gefärbt. Die Elution überschüssigen Farbstoffs erfolgte mit 70 % (v/v) Ethanol-Lösung in Wasser. War bei der SDS-PAGE-Trennung nur eine einzige Probe in der gesamten Gelbreite aufgetrennt worden, schnitt ich die CN-Membran nach Abtrennen der Spuren mit Markerproteinen in 2 oder 4 mm breite Streifen, die der Untersuchung der Immunoblot-Reaktivität von Seren und monoklonalen Antikörpern dienten. Antigenbeschichtete CN-Blätter

ließen sich zwischen Fließpapier getrocknet bei 4°C bis zum Gebrauch lagern.

4.10.9.2 Immunfärbung

4.10.9.2.1 Lösungen

Blockpuffer: 20,0 ml Pferdeserum (Seromed, Berlin); PBS ad 100,0 ml

Peroxidase-Substrat: (s. 4.10.1.3)

Alkalische Phosphatase-Substratpuffer: 12,1 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; 0,2 g Magnesiumchlorid · 6 H_2O; Aqua dest. ad 500,0 ml; pH 8,0 mit HCl einstellen.

Alkalische-Phosphatase-Substrat (AP-Substrat): 150 mg Fast Red TR Salz (Sigma); Substratpuffer ad 25,0 ml. 2 mg Naphthol-AS-MX-Phosphat (Sigma); Aqua dest. ad 25,0 ml. Beide Lösungen unmittelbar vor dem Gebrauch vereinigen und filtrieren.

4.10.8.2.2 Immunfärbung

CN-Membranen wurden zunächst 30 min in Blockpuffer bei RT geschwenkt. Es folgte eine 1 - 5 h Inkubation mit Seren bzw. monoklonalen Antikörpern (Verdünnung in 20 % Pferdeserum in PBS; Seren 1 : 20 bis 1 : 50; monoklonale Antikörper 1 : 20 bis 1 : 5000). Nach dreimaligem Waschen mit 5 % Pferdeserum in PBS gab ich peroxidase- bzw. biotinmarkiertes Anti-Spezies-IgG oder peroxidasegekoppeltes Concanavalin A in geeigneter

Verdünnung zu und setzte die Inkubation bei RT 60 min fort. Bei der Verwendung von biotinylierten Konjugaten folgten drei weitere Waschschritte vor der Zugabe von Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Inkubationszeit 30 min, RT). Nach viermaligem Waschen in PBS wurde Peroxidase-Substrat zugegeben und auf den CN-Membranen belassen, bis die gewünschte Farbintensität der Banden erreicht war. Abschließend wässerte ich das gefärbte Cellulosenitrat kurz und ließ es zwischen Filterpapierlagen trocknen.
Bisweilen fand anstelle des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes Streptavidin Verwendung. Diese Substanz verfügt ähnlich wie Avidin über vier Bindungsstellen für Biotin. Eine diente der Reaktion mit dem biotinylierten Konjugat, die übrigen Valenzen wurden in einem weiteren Inkubationschritt mit biotinylierter alkalischer Phosphatase abgesättigt. Die abschließende Färbung erfolgte mittels eines histochemischen AP-Substrates.

4.10.9.3 Bestimmung der Molekulargewichte

Die relativen Molekulargewichte der Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen und auf CN-Membranen bestimmte ich durch Vergleich der Migrationsfaktoren (MF) dieser Banden mit denen der Markerproteine. Die MF-Werte ergaben sich aus dem Quotient, der aus dem Verhältnis der Wanderungsstrecke einer Bande zur Gesamtlaufstrecke gebildet wird. Letztere wurde als die Entfernung vom oberen Rand des Trenngels bis zum Bromphenolblaumarker am unteren Gelrand veranschlagt. Mit Hilfe der MF-Werte der Markerproteine konnte eine Eichkurve erstellt werden, die das Ablesen der relativen Molekulargewichte für die aufgetrennten Proteine über deren Migrationsfaktoren erlaubte.

4.10.10 Immunelektronenmikroskopie

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Hans Gelderblom und Frau Silvia Pietschmann (Robert-Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes) durchgeführt. Herrn Dr. Gelderblom und Frau Pietschmann möchte ich ebenso wie auch Herrn Reupke, der teilweise die Aufgabe des Erstellens von Ultradunnschnitten übernahm, herzlich danken.

Virus produzierende Vero-Zellen wurden in Terasaki-Gewebekulturplatten (Falkon, Div. Becton, Dickinson & Co., Oxnard, Kalifornien, USA) *in situ* markiert (GELDERBLOM u. SCHWARZ, 1976). 24 bis 28 h nach der Infektion mit 1,0 PBE/Zelle erfolgte eine leichte Vorfixierung mit 0,25 % Glutardialdehyd-Lösung in PBS. Nach dreimaligem Waschen mit PBS blockierte ich noch freie Aldehydgruppen durch 0,1 % bovines Serumalbumin (BSA) und 10 mM L-Lysin, gelöst in PBS. Danach erfolgte die Inkubation mit Serum bzw. monoklonalen Antikörpern 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zugabe von Ferritin-markiertem Anti-Spezies-IgG (Cappel Laboratories, Cochranville, USA) und eine weitere 30 min Inkubation bei 37°C schlossen sich an. Überschüssiges Ferritin-Konjugat entfernte ich durch zweimaliges Waschen und fixierte die Ansätze mit 2,5 % Glutardialdehyd in PBS. Nach einer *in situ* Einbettung in Epon-812-Kunstharz schnitt ich die Präparate mit einer Laubsäge aus, spaltete sie von der Bodenplatte des Kulturgefäßes ab und bettete sie erneut in Kunstharz ein. Ultradünnschnitte der Zellen wurden auf 200 mesh Netzchen aufgebracht und mit Bleicitrat (40 mg/ml) nachkontrastiert. Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Siemens Elektronenmikroskop 101.

5 ERGEBNISSE

Die Wiedergabe der Resultate meiner Arbeit läßt sich gliedern in die Herstellung und Charakterisierung gegen verschiedene Herpesviren gerichteter monoklonaler Antikörper einerseits und ihren Einsatz zur Aufklärung von Antigenverwandtschaften andererseits. Zur besseren Übersicht sind alle verwendeten Seren und ihre wichtigsten Eigenschaften am Ende des Ergebnisteils in Tabelle 11 zusammengefaßt.

5.1 Charakterisierung monoklonaler Antikörper

5.1.1 Monoklonale Antikörper gegen SHV-1

5.1.1.1 Antikörperspiegel bei immunisierten Mäusen

Balb/c-Mäuse wurden mit Lysaten SHV-1-infizierter A31B77-Zellen (s. 4.7.1). immunisiert. 2 - 4 Wochen nach der Grundimmunisierung waren neutralisierende Antikörper gegen SHV-1 meßbar, die Titer stiegen infolge zweier Boosterinjektionen weiter an, erreichten nach 6-8 Wochen ihren Höhepunkt und sanken danach ab (Abb. 5).

5.1.1.2 Herstellung und Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Mit Hilfe der in Abschnitt 4.6 detaillierten Techniken konnten 68 Hybridoma-Zellinien etabliert werden, die gegen Antigene SHV-1-infizierter Zellen gerichtete monoklonale Antikörper produzierten. Alle Antikörper erkannten Epitope auf der Plasmamembran infizierter ML-Zellen, 32 monoklonale Antikörper reagierten zumindest präferentiell mit Antigen im

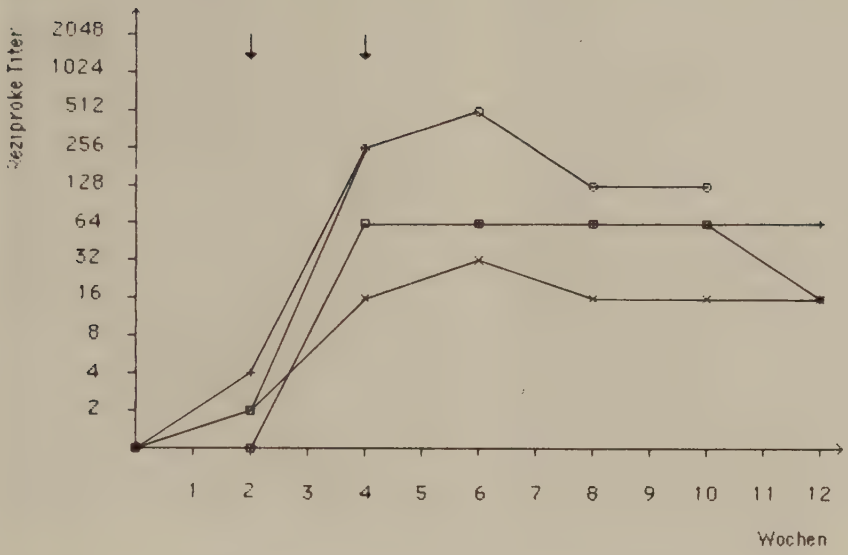


Abb. 5. Entwicklung neutralisierender Antikörper gegen SHV-1 in Balb/c-Mäusen

Vier Mäuse wurden mit Lysaten SHV-1-infizierter A31B77-Zellen immunisiert und die Bildung von Antikörpern im Neutralisationstest gemessen. Jedes Symbol (+, ×, □, ○) repräsentiert ein Tier. Die Zeitpunkte der Boosterinjektionen werden durch Pfeile angezeigt

Zytoplasma und 26 vorwiegend oder ausschließlich mit kernassoziierten Determinanten, 10 Antikörper banden an diffus in der infizierten Zelle verteilte Strukturen (Abb. 6). Bei den Antikörpern, die mit Epitopen im Zellplasma reagierten, waren weiter differenzierbare Erkennungsmuster zu registrieren: einige erzeugten eine diffuse Färbung des gesamten Zytosols, andere banden dort an membranöse Strukturen, wieder andere ließen derartige Formationen in der Nähe der Zellmembran deutlich werden. Obwohl dem SHV-1-Impfstamm Dessau ein 130 K-Glykoprotein fehlt (BUND, 1983), konnte kein Antikörper gefunden werden, mit dem die Unterscheidung von Dekking- und Dessau-infizierten Zellen möglich gewesen wäre. Im Gegenteil, alle Antikörper, die mit SHV-1 (Stamm Dekking) reagierten, verhielten sich im Zell-ELISA völlig vergleichbar auf Zellen, die mit SHV-1 (Stamm Dessau) inokuliert worden waren. 36 verschiedene Antikörper wurden im

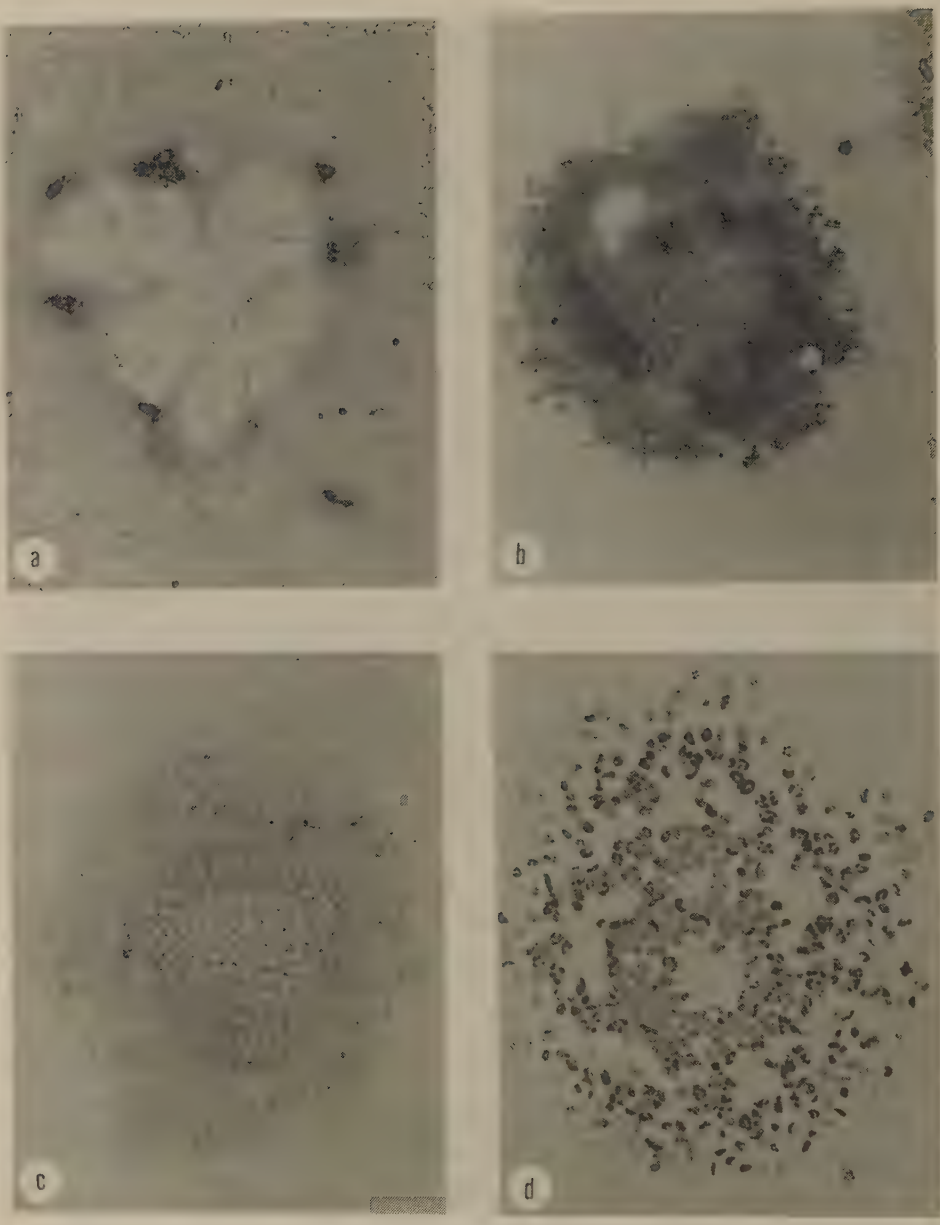


Abb. 6: Verhalten der gegen SHV-1 gerichteten monoklonalen Antikörper im Zell-ELISA
(a): Q8H12, Zelloberfläche
(b): Q6A5, Zellinneres
(c): Q13D11, Zellinneres
(d): Q8H12, Zellinneres

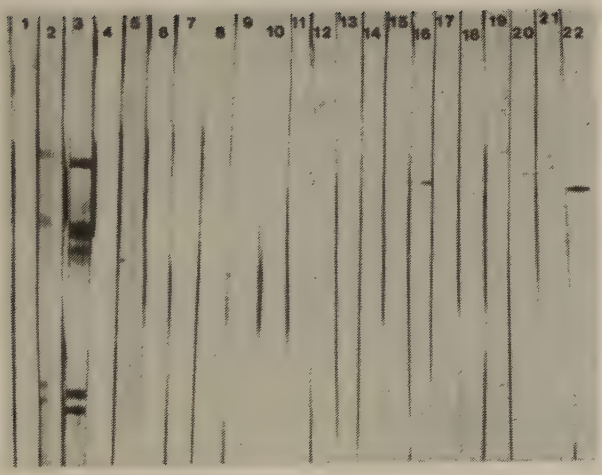


Abb. 7: Immunoblot-Reaktivität der gegen SHV-1 gerichteten monoklonalen Antikörper

Die Proteine SHV-1-infizierter Zellen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf CN-Membranen übertragen, die in Streifen geschnitten als Antigenträger für die Immunfärbung dienten.

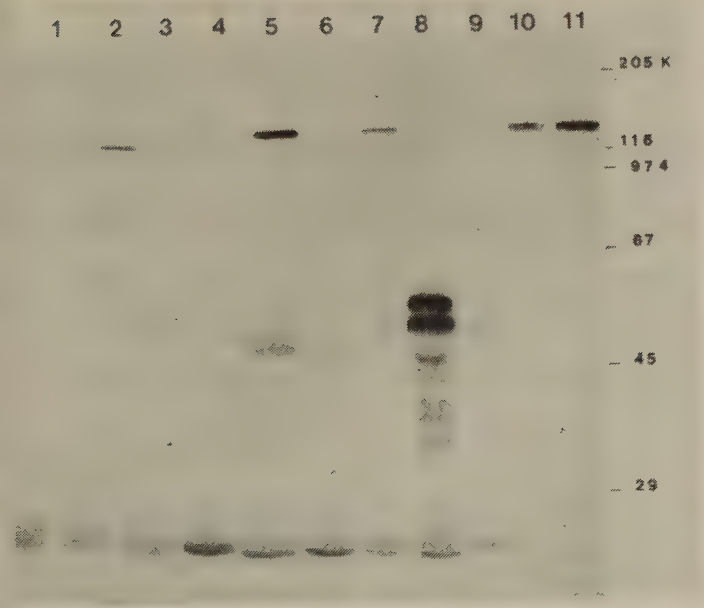
Bahn	1: Q9A5	Bahn	9: Q9F7 II	Bahn	16: Q14E2
	2: Q2H1		10: Q18E6		17: Q11B3
	3: Q13E1		11: Q19B8		18: Q16B2
	4: Q6A7		12: Q12D4		19: Q13D11
	5: Q22B6		13: Q14E2		20: Q7D8
	6: Q5G6		14: Q16B3		21: Q15D1
	7: Q6G4		15: Q12D4		22: Q8H12
	8: Q9E4				

Neutralisationstest eingesetzt, jedoch war bei keinem von ihnen eine neutralisierende Wirkung auf SHV-1 zu beobachten.

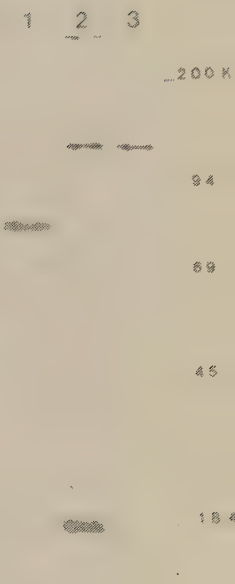
Sechs monoklonale Antikörper reagierten positiv in der Immunoblot-Technik (Abb. 7). Zwei von ihnen (Q8H12, Q14E2) erkannten ein Protein mit einem relativen Molekulargewicht von etwa 135 K, zwei weitere (Q12D4, Q13D11) reagierten mit einem Polypeptid bei 45 K, und die beiden übrigen erkannten 4 bis 5 Banden mit Molekulargewichten zwischen etwa 150 und 30 K. Für nähere Untersuchungen wählte ich sieben monoklonale Antikörper mit unterschiedlichen Reaktionsmustern aus, deren Immunglobulin- bzw. IgG-Subklasse ich zunächst mit Subklassen-spezifischen Antiseren im ELISA bestimmte (Tab.3).

Um festzustellen, ob einige dieser Antikörper, die im Immunoblot nicht reagiert hatten, Antigene erkennen, die mit dem Antikörper Q8H12 nachweisbar sind, wurde folgende Technik angewandt. Ich setzte die monoklonalen Antikörper in Immunpräzipitationen mit Lysaten SHV-1 infizierter Zellen ein, trennte die Reaktionsprodukte in der SDS-PAGE auf und überführte die separierten Proteine auf eine CN-Membran. Eine abschließende Immunfärbung des CN-Blattes unter Einsatz des Antikörpers Q8H12, der im Immunoblot positiv reagierte und das erwähnte 135 K Protein erkannte, sollte klären, ob die von den übrigen untersuchten monoklonalen Antikörpern immunpräzipitierten Antigene mit dem von Q8H12 erkannten Polypeptid gemeinsame Epitope besaßen. Dies traf für die Antikörper 09A5, 09D5, Q6A5,Q17C11 und Q21G6 zu (Abb. 8 a). Dabei präzipitierte Antikörper 09D5 das 135 K Antigen nur in geringen Mengen, reicherte jedoch mindestens 4 Polypeptide mit relativen Moleku- largewichten von 118, 100, 82 und 62 K an, die mit Q8H12 reagierten. Die in der Abbildung erkennbaren Banden bei 46 - 55 K und 25 K werden durch die schweren und leichten Ketten des zur Präzipitation verwendeten Antikörpers verursacht.

Um abzuklären, ob das von den monoklonalen Antikörpern erkannte Protein glykosyliert ist, wurden Immunpräzipitationen mit Lysaten aus ^{3}H-Glucosamin-markierten SHV-1-infizierten ML-Zellen durchgeführt. Nach SDS-PAGE der Präzipitate zeigte die Autoradiographie des Gels, daß ein Glykoprotein mit



a



b

Abb. 8: Immunpräzipitationen mit SHV-1-spezifischen monoklonalen Antikörpern

a): An anti-Maus-IgG-Agarose"beads" gebundene Antikörper wurden in Immunpräzipitationen mit Lysaten SHV-1-infizierter Zellen eingesetzt, die Präzipitate der SDS-PAGE unterzogen und auf eine CN-Membran übertragen, die dann mit dem Antikörper Q8H12 immungefärbt wurde.

Bahn 1: Q9A5	Bahn 5: Q8H12	Bahn 9: "beads" ohne Antikörper
2: Q9D5	6: Q17C11	10: SHV-1
3: Q6A5	7: Q21G6	11: infizierte Zellen
4: Q6A7	8: E23F12	

b): Lysate ^{3}H-Glucosamin-markierter Zellen fanden bei Immunpräzipitationen mit monoklonalen Antikörpern Verwendung. Die Abbildung zeigt die Autoradiographie des SDS-Polyacrylamidgels, in dem die Präzipitate analysiert wurden.

Bahn 1: Lysat Bahn 2: Q8H12 Bahn 3: Q6A7

einem Molekulargewicht von 135 K erkannt worden war (Abb. 8 b).
In Tabelle 3 habe ich die wichtigsten Eigenschaften der näher untersuchten SHV-1-spezifischen Antikörper zusammengefaßt.

Monoklonale Antikörper	Immunglobulin-klasse	Epitop-lokalisierung	Molekulargewicht der erkannten Proteine [K]
09A5	G 1	Z	135
09D5	G 2b	Z	118, 100, 82, 62
Q6A5	M	Z	unbekannt
Q6A7	G 1	K	135
Q8H12	G 1	K	135
Q17C11	?*	Z	135
Q21G6	A	Z	135

Tab. 3: Zusammenfassung der Eigenschaften einiger monoklonaler Antikörper mit Spezifität für SHV-1

(Z): Erkennung zytoplasmatischen Antigens; (K): Erkennung von kernassoziiertem Antigen. Die Molekulargewichte der erkannten Polypeptide wurden durch SDS-PAGE von Immunpräzipitaten bestimmt (vgl. Abb. 8).
*(?): Immunglobulinklasse nicht bestimmbar.

5.1.2 Proteine des BHV-2

Da über die Strukturproteine des BHV-2 bisher keine Informationen vorlagen, war es notwendig, sich vor der Charakterisierung gegen einzelne virale Antigene gerichteter monoklonaler Antikörper einen Überblick über die Gesamtzahl der Polypeptide zu verschaffen, aus denen sich das Virus zusammensetzt. Wegen der niedrigen Virustiter von BHV-2, die eine radioaktive Markierung der Virusstrukturproteine während einer Einschritt-Vermehrung nicht erlaubten, suchte ich nach einer Alternative zur übersichtsartigen Darstellung der viralen Strukturproteine, der Glykoproteine und der hauptimmunogenen Komponenten des BHV-2.

Zu diesem Zweck reinigte ich Überstandsvirus im Saccharose-Gradienten (20 - 70 % w/v) und bestimmte die Infektiositätstiter in den Fraktionen des ausgetropften Gradienten. Wie in Abbildung 9 wiedergegeben, wurde die höchste Konzentration an infektiösem Virus bei einer Dichte von 1,24 bis 1,25 g/cm^3 gemessen. In den gleichen Fraktionen war nach SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung die intensivste Färbung der Polypeptide zu beobachten. Sie enthielten 50 bis 55 unterscheidbare Banden, die im Molekulargewicht zwischen 25 und 235 K lagen; 25 von ihnen traten in unterschiedlicher Breite und Farbintensität in allen Fraktionen auf (Abb. 10 a). Glykoproteine wurden nach Auftrennung in der SDS-PAGE und Transfer auf eine CN-Membran durch die Reaktion mit Concanavalin A nachgewiesen, an das Peroxidase kovalent gekoppelt war (Abb.11). In allen Fraktionen traten einzelne Banden bei 235, 152 K und eine Gruppe von 5 bis 7 glykosilierten Polypeptiden zwischen 25 und 35 K auf, die jedoch in den hochtitrigen Fraktionen intensiver angefärbt wurden. In den Fraktionen 3 und 4 reagierten 25 Banden mit Peroxidase-konjugiertem Concanavalin A. In einem Immunansatz mit dem im folgenden näher beschriebenen monoklonalen Antikörper E23F12 zeigte sich, daß dieser Antikörper eine zuvor mit Concanavalin A-Peroxidase angefärbte Doppelbande bei 130 K erkannte. Der Nachweis der Antigen-Antikörper-Bindung erfolgte in diesem Fall mit biotinyliertem Anti-Maus-IgG, Streptavidin und biotinylierter alkalischer Phosphatase.

Ein bei der Immunfärbung eines Westernblots eingesetztes, vom Schaf stammendes Hyperimmunserum gegen BHV-2 reagierte mit mindestens 14 Banden in den stark virushaltigen Fraktionen der BHV-2-Reinigung (Abb. 10 b).

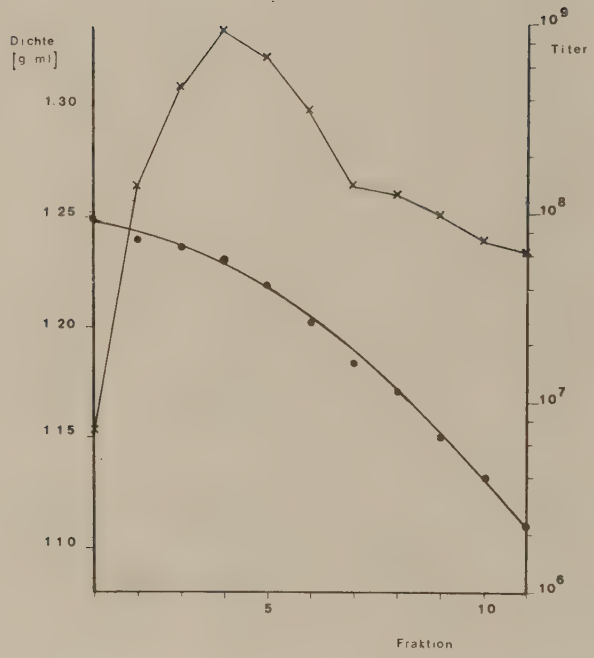


Abb. 9: Reinigung von BHV-2 durch Gleichgewichtslauf im Saccharose-Dichtegradienten

(x): Virustiter im Plaquetest
(●): Saccharosedichte

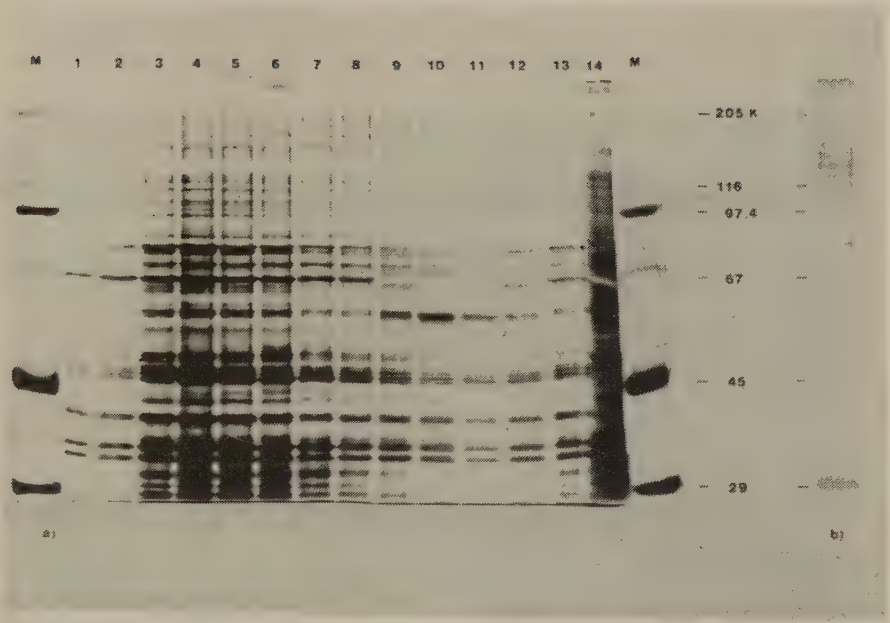


Abb. 10: Virusstrukturproteine des BHV-2

a) Virus wurde in einem 20-70 % Saccharosegradienten gereinigt, der Gradient ausgetropft und je ein Aliquot der Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Die Abbildung zeigt die Silberfärbung eines Gels.
M: Molekulargewichtsmarker; Bahnen 1-13: Aliquots der Fraktionen 1-13; Bahn 14: Lysat Vero-Zellen, BHV-2-infiziert

b) Hauptimmunogene Komponenten des BHV-2
Im Saccharosegradienten gereinigtes BHV-2 wurde nach SDS-PAGE und Westernblot mit dem Schaf-Hyperimmunserum S 297 immungefärbt.

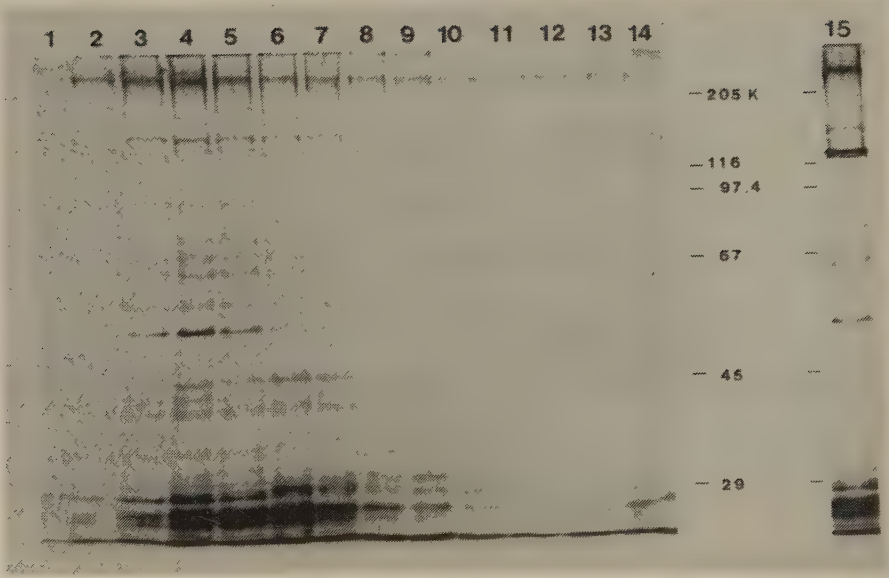


Abb. 11: Glykoproteine des BHV-2

Virus wurde in einem 20-70 % Saccharosegradienten gereinigt, der Gradient ausgetropft, Aliquots der Fraktionen der SDS-PAGE unterzogen und die aufgetrennten Polypeptide auf eine CN-Membran übertragen. Durch Bindung von Concanavalin-A-Peroxidase und anschließender Substratreaktion konnten Glykoproteine nachgewiesen werden. Bahnen 1-13: Aliquots der Fraktionen; Bahn 14: Lysat BHV-2-infizierter Vero-Zellen; Bahn 15: Zusätzliche Immunfärbung der Bahn 4 mit dem monoklonalen Antikörper E23F12 und alkalischer Phosphatase.

5.1.3 Charakterisierung BHV-2 spezifischer monoklonaler Antikörper

5.1.3.1 Zell-ELISA

Für weitere Versuche wurden sieben mit HSV kreuzreagierende Antikörper ausgewählt. Sie reagierten alle mit Epitopen, die auf der Oberfläche BHV-2-infizierter Zellen nachweisbar waren.

Monoklonale Antikörper	IgG[1] Subklasse	Reaktivität im ELISA	
		O[2]	I[3]
C2D8	1	+	Z
E1D3	1	+	Z
E18B11	2a	+	K(Z)
E18E3	1	+	Z
E22F12	2b	+	K(Z)
E23F12	2b	+	K(Z)
E23H2	2b	+	K

Tab. 4 Ergebnis der Charakterisierung der gegen BHV-2 gerichteten monoklonalen Antikörper mittels Zell-ELISA

1) Immunglobulin G
2) Erkennung von Oberflächenantigenen glutardialdehyd-fixierter infizierter Vero-Zellen. (+): positive Reaktion.
3) Erkennung von zytoplasmatischem (Z) bzw. kernassoziiertem Antigen (K) in formaldehyd-fixierten infizierten Vero-Zellen.

Drei von ihnen erkannten im Zytoplasma lokalisierte Determinanten, vier reagierten vorwiegend mit kernassoziiertem Antigen in infizierten Zellen, die durch Detergenz-Behandlung aufgeschlossen worden waren (Tab 4, Abb. 12).

5.1.3.2 Indirekter Immunfluoreszenztest

Auf Deckgläschen fixierte BHV-2-infizierten Vero-Zellen wurden mit monoklonalen Antikörpern inkubiert und gebundenes IgG durch Anti-Maus-IgG-FITC-Konjugat nachgewiesen. Dabei zeigte sich, daß alle Antikörper mit der Oberfläche infizierter Zellen reagierten, jedoch bildete sich nach Inkubation mit den Antikörpern C2D8, E1D3, E18B11, E18E3 eine diffuse Fluoreszenz auf allen infizierten Zellen aus, während eine andere (E22F12, E23F12, E23H2) eine starke Fluoreszenz einzelner Flecken auf einem Teil der infizierten Zellen verursachte. Untersuchungen zur Lokalisation der Epitope in der Zelle zeigten, daß C2D8, E1D3, E18B11 und E18E3 nicht mit den Zellkernen reagierten, wogegen E22F12, E23F12 und E23H2 kernassoziiertes Antigen deutlich markierte (Abb 12). Die Resultate der Immunfluoreszenztests sind in Tabelle 5 zusammengefaßt

Monoklonale Antikörper	Reaktivität im IFT	
	O[1]	I[2]
C2D8	+	Z
E1D3	+	Z
E18B11	+	Z
E18E3	+	Z
E22F12	+	K(Z)
E23F12	+	K(Z)
E23H2	+	K

Tab. 5: Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)

[1] Erkennung von Oberflächenantigenen formaldehyd-fixierter BHV-infizierter Vero-Zellen. (+): positive Reaktion;
[2] Erkennung von zytoplasmatischem (Z) bzw. kernassoziiertem Antigen (K) in formaldehyd-fixierten infizierten Vero-Zellen.

5.1.3.3 Neutralisationstest

Im folgenden testete ich die monoklonalen Antikörper auf ihre neutralisierenden Eigenschaften. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 wiedergegeben. Die Antikörper C2D8, E1D3 und E18E3 inaktivierten BHV-2 in Abwesenheit von Komplement. Auffällig war, daß der Antikörper E23F12 die Infektionstiter im Vergleich zu FKS bzw. einem nichtneutralisierenden monoklonalen Antikörper auf Werte des 1,3 bis 2-fachen ansteigen ließ. Beim Verdünnen von E23F12 gingen die Plaquezahlen allmählich auf die in

Monoklonale Antikörper	Neutralisation	
	m. C' [1]	o. C' [2]
C2D8	63	65
E1D3*	25	28
E18B11	-	-
E18E3	188	75
E22F12	22	-
E23F12	60	e [3]

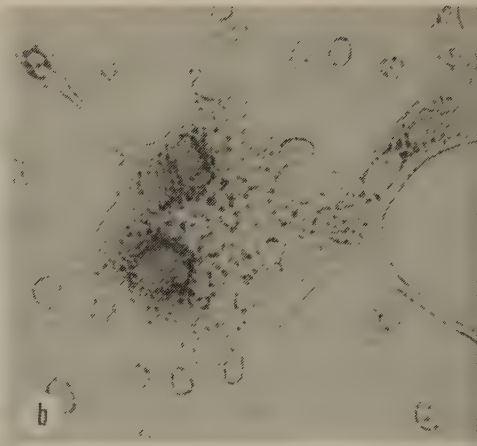
Tab. 6: Neutralisationstest mit BHV-2

Reziproke Titer für 50 % Plaquereduktion sind angegeben. Die ELISA-Titer der verwendeten Aszitesflüssigkeiten lagen zwischen $1 - 2 \times 10^6$.

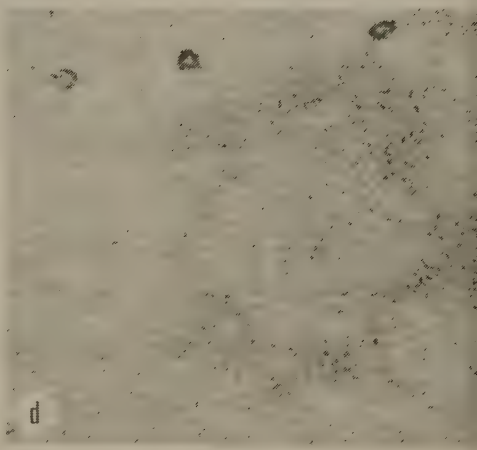
[1] Test in Gegenwart von Komplement
[2] Test ohne Komplement
[3] Infektionstiter höher als in Kontrollen mit FCS oder einem nicht neutralisierenden monoklonalen Antikörper.
* Da sich mit diesem Klon keine Aszites produzieren ließ,wurde konzentrierter Kulturüberstand eingesetzt (ELISA-Titer: 2×10^5).

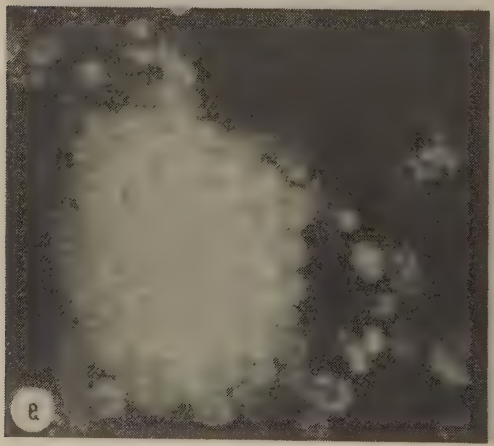
den Kontrollen gefundenen Werte zurück, ein Befund, der die Spezifität der Beobachtung unterstreicht. Es ist weiterhin hervorzuheben, daß die Antikörper E22F12 und E23F12 nur in Gegenwart von Kaninchenkomplement BHV-2 neutralisierten. Dagegen war erwartungsgemäß bei den Antikörpern C2D8, E1D3 und E18E3 keine komplementabhängige Neutralisation zu beobachten, da

a


b

c


d


e

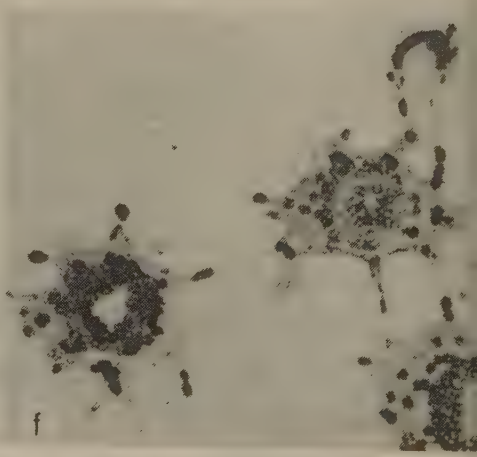

f

Abb. 12: ELISA und IFT mit BHV-2 spezifischen monoklonalen Antikörpern

IFT: Auf Deckgläschen gewachsene BHV-2-infizierte Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert, zur Detektion interner Antigene durch 1 % Triton X-100 aufgeschlossen und mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit FITC konjugiertem anti-Maus-IgG.
ELISA: In 96-Loch-Microtiterplatten gewachsene Zellen wurden mit 25 PBE pro Vertiefung infiziert und 20-28 h p.i. mit Glutardialdehyd (Oberflächenantigene) oder Formaldehyd fixiert. Zur Erkennung zellinterner Epitope folgte eine Behandlung mit Triton X-100. Nach Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern wurde gebundenes Maus-IgG mit Meerrettich-Peroxidase-Konjugat nachgewiesen. Dabei diente H_2O_2 in Verbindung mit 3-Amino-9-ethyl-carbazol als Substrat.

(a) IFT, Oberflächenantigene, Antikörper E1D3; (b) ELISA, Oberflächenantigene, E1D3; (c) IFT, intrazelluläre Antigene, C2D8; (d) ELISA, intrazelluläre Antigene, C2D8; (e) IFT, intrazelluläre Antigene, E23F12; (f) ELISA, intrazelluläre Antigene, E23F12.

murines IgG der Subklasse 1 bekanntermaßen nicht fähig ist, Komplement zu binden (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.*, 1984).

5.1.3.4 Test auf penetrationshemmende Wirkung

Um abzuklären, ob die neutralisierende Wirkung einiger monoklonaler Antikörper auf der Hemmung der Penetration des adsorbierten Virus in die Zelle beruht, wählte ich die Antikörper C2D8 und E23F12 aus und verglich sie mit dem bovinen Rekonvaleszentenserum AS 8. BHV-2 wurde die Adsorption an Zellen bei 4°C gestattet und Antikörper ebenfalls bei 4°C für 1 h zugegeben, so daß die Immunglobuline an die adsorbierten, aber nicht penetrierenden Viren binden konnten. Anschließend inkubierte ich die Ansätze bei 37°C weiter. Das Versuchsergebnis zeigte, daß die beiden monoklonalen Antikörper im Gegensatz zu AS 8 die Penetration nicht behindern.

5.1.3.5 Fusionshemmung

Mit dieser Versuchsreihe wollte ich klären, ob die Antikörper C2D8, E1D3 und E23F12 die Fusion infizierter Zellen zu Polykaryozyten verhindern. Dazu wurden Zellen eine Stunde nach der Infektion mit BHV-2 mit antikörperhaltigem Medium überschichtet. Es zeigte sich, daß weder die monoklonalen Antikörper noch das zu Kontrollzwecken eingesetzte AS 8-Serum die Ausbildung von Synzytien unterbinden konnten.

5.1.3.5 Reaktivität im Immunoblot

Von sechs untersuchten monoklonalen Antikörpern reagierten unter Standardbedingungen (1 h Inkubation von Antikörpern und Antigen, RT) zwei

positiv. Sie erkannten ein Protein mit einem Molekulargewicht von 130 K. Bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 5 h stellte sich heraus, daß auch die übrigen vier monoklonalen Antikörper mit einer Bande gleicher elektrophoretischer Mobilität reagierten (Abb. 13). Wurden Lysate aus BHV-2-infizierten Zellen unter nichtreduzierenden Bedingungen (in Abwesenheit von 2-Mercaptoethanol) der SDS-PAGE unterzogen und auf Cellulosenitrat überführt, erkannte der Antikörper E23F12 auf diesen Membranen neben dem 130 K Protein eine weitere Bande bei 170 K. Antikörper C2D8, der das 130 K Polypeptid unter reduzierenden Bedingungen schwach anfärbte, band unter nichtreduzierenden Bedingungen zusätzlich an eine diffuse Antigenbande bei 43-50 K (Abb. 15). Keiner der Antikörper reagierte mit den Proteinen uninfizierter Vero-Zellen.

In einem weiteren Experiment setzte ich gereinigtes BHV-2 (Stamm BMV) unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen ein. Bei der Immunfärbung mit E23F12 stellte sich heraus, daß in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol eine Bande mit 130 K erkannt wurde. Das korrespondierende Experiment unter nichtreduzierenden Bedingungen zeigte, daß E23F12 mit mindestens 10 Banden in dieser Präparation reagierte. Etwa 5 lagen im Molekulargewicht über 200 K, ein Protein bandete bei 170 K, ein weiteres bei 130 K und mindestens drei Polypeptide verteilten sich im Molekulargewichtsbereich von 105-128 K.

5.1.3.5 Immunpräzipitationen

Da die Ergebnisse der Immunoblot-Versuche darauf hindeuteten, daß mehrere Antikörper möglicherweise das gleiche Antigen erkannten, versuchte ich diese Frage mit Versuchsansätzen zu klären, die ich bereits bei der Charakterisierung der gegen SHV-1 gerichteten monoklonalen Antikörper angewendet hatte. Sechs Antikörper wurden in Immunpräzipitationen mit Lysaten aus BHV-2-infizierten Zellen eingesetzt, die Präzipitate der

SDS-PAGE unterzogen und die aufgetrennten Proteine auf Cellulosenitrat transferiert. Bei der abschließenden Immunfärbereaktion mit dem Antikörper E23F12, stellte sich heraus, daß die untersuchten Antikörper alle ein 130 K Protein präzipitiert hatten, das im Immunansatz auf der CN-Membran stark mit E23F12 reagierte. Je nach dem, welcher Antikörper in der Immunpräzipitation eingesetzt worden war, trat jedoch eine mehr oder weniger intensive Anfärbung eines ganzen Spektrums von Banden mit höherer elektrophoretischer Mobilität auf (Abb.14) In Immunpräzipitationen mit Lysaten aus uninfizierten Vero-Zellen konnte weder mit E23F12 noch mit dem Rekonvaleszentenserum AS 8 präzipitiertes Antigen nachgewiesen werden.

Weiterhin wollte ich abklären, ob das von den monoklonalen Antikörpern erkannte Protein glykosyliert vorliegt. Dazu wurden Immunpräzipitationen mit Lysaten aus ^{3}H-Glucosamin-markierten Zellen durchgeführt, die Präzipitate der SDS-PAGE unterzogen, das Polyacrylamidgel getrocknet und fluorographiert. Das in Abbildung 14, Bahnen a) und b) wiedergegebene Autoradiogramm belegt, daß das jeweils präzipitierte 130 K Polypeptid ein Glykoprotein ist.

Kreuzweise durchgeführte Immunpräzipitationen mit den Antikörpern C2D8, SDS-PAGE der Präzipitate unter nichtreduzierenden Bedingungen, Westernblot und anschließende Immunfärbung mit den Antikörpern C2D8 und E23F12 ergaben: C2D8 erkannte kein von E23F12 präzipitiertes Protein, während der Antikörper in der mit ihm selbst vorgenommenen Präzipitation zwei Banden bei 170 K und 43 K anfärbte. E23F12 reagierte in Präzipitation und Immunoblot neben der Bande bei 130 K, die C2D8 offenbar nicht präzipitiert hatte, mit zwei weiteren Polypeptiden bei 170 und 43 K, die beide auch von C2D8 erkannt werden, mit letzterem allerdings nur schwach (Abb.15). Die starken Signale unterhalb von 200 K wurden durch die bei der Immunpräzipitation verwendeten Immunglobuline verursacht.

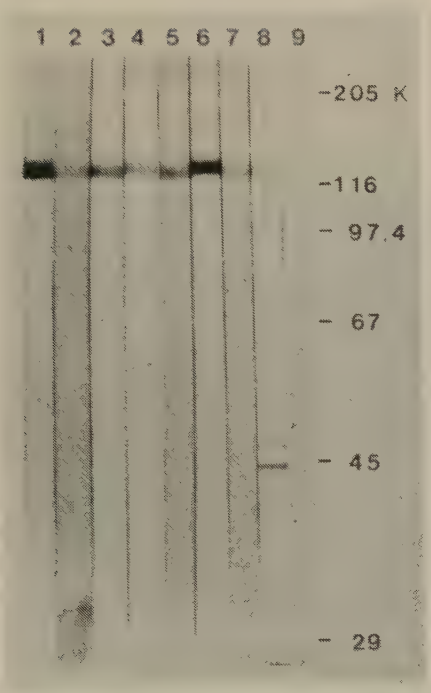


Abb. 13: BHV-2 spezifische Antikörper im Immunoblot

Lysate aus BHV-2-infizierten Zellen wurden der SDS-PAGE unterzogen und die aufgetrennten Polypeptide auf Cellulosenitrat transferiert. Nach Inkubation von Streifen der CN-Membran mit Antikörpern wurden gebundene Immunglobuline mit anti-Maus-IgG-Peroxidase- Konjugat nachgewiesen.

Bahn 1: E23F12
2: C2D8
3: E1D3
4: E18B11
5: E18E3
6: E22F12
7: E11A12
8: E18F2
9: Kontrollserum, nicht immunisierte Maus

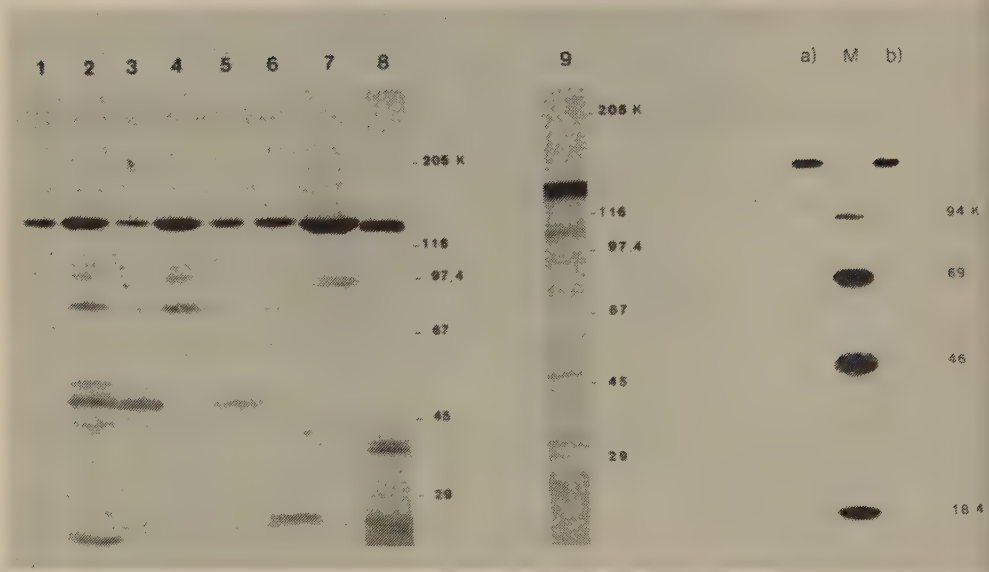


Abb. 14: Immunpräzipitationen und Westernblots mit BHV-2

a) Mit monoklonalen Antikörpern wurden Antigene aus Lysaten BHV-2 infizierter Vero-Zellen immunpräzipitiert, die Präzipitate der SDS-PAGE unterzogen, auf CN-Membranen transferiert und mit dem Antikörper E23F12 immungefärbt.

Bahn 1: C2D8 Bahn 4: E18B11 Bahn 7: E23F12
2: E23F12 5: E18E3 8: Lysat infiz. Zellen
3: E1D3 6: E11A12 9: gereinigtes Virus

b) Immunpräzipitationen mit Lysaten aus ^{3}H-Glucosamin-markierten Vero-Zellen

Bahn a): C2D8 Bahn M: Mol.-gew.-standards Bahn b): E23F12

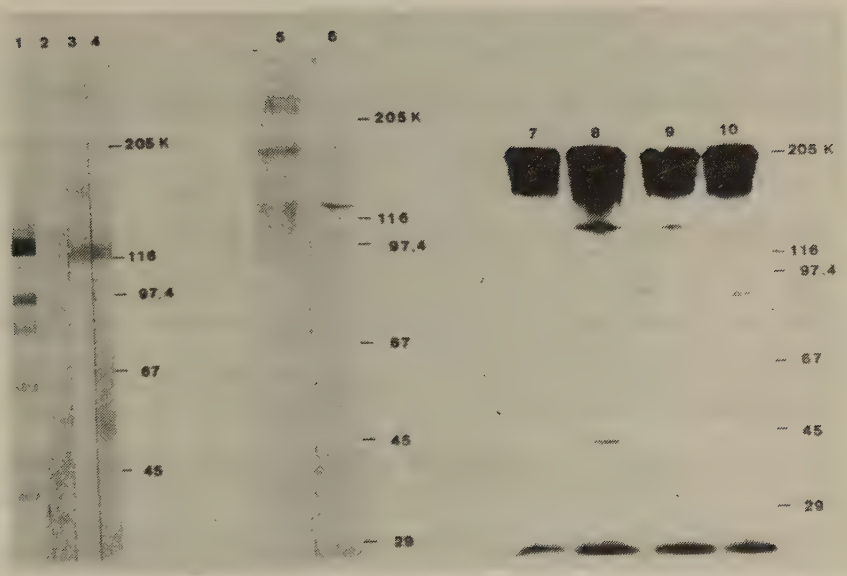


Abb.15: Vergleich BHV-2-spezifischer Antigene unter reduzierenden und nichtreduzierenden SDS-PAGE-Bedingungen

Lysate BHV-2-infizierter Zellen (Bahnen 1-4), Immunpräzipitate (Bahnen 7-10) oder gereinigtes Virus (Bahnen 5, 6) wurden unter reduzierenden (Bahnen 1, 2) bzw. nichtreduzierenden Bedingungen (Bahnen 3-10) SDS-PAGE-separiert, auf CN-Membranen übertragen und anschließend immungefärbt.

Bahn 1:	Lysat; reduz. Bedingungen, Immunfärbung:	E23F12
Bahn 2:	Lysat; reduz. " "	C2D8
Bahn 3:	Lysat; nichtreduz. " "	E23F12
Bahn 4:	Lysat; nichtreduz. " "	C2D8
Bahn 5:	gerein. Virus, nichtreduz., "	E23F12
Bahn 6:	gerein. Virus, reduz., "	E23F12
Bahn 7:	Immunpräzip. mit E23F12, Immunfärbung:	C2D8
Bahn 8:	" " C2D8, "	C2D8
Bahn 9:	" " C2D8, "	E23F12
Bahn 10:	" " E23F12, "	E23F12

5.1.3.6 Nachweis des 130 K Glykoproteins in Präparationen von gereinigtem BHV-2 Überstandsvirus bzw. Kapsiden

Da verschiedene monoklonale Antikörper sowohl im Zell-ELISA als auch im IFT mit kernassoziiertem oder zytoplasmatischen Antigen reagierten und sich auch Viruspartikel in diesen Zellkompartimenten mit den entsprechenden Immunglobulinen markieren ließen (S. PIETSCHMANN und H. GELDERBLOM, persönliche Mitteilung vom 2.2.86) stellte sich die Frage, ob sich die Befunde auch mit biochemischen Methoden nachvollziehen ließen. Dazu reinigte ich in Kulturüberständen von BHV-2-infizierten Zellen enthaltenes Virus sowie Kapside aus dem Zytoplasma bzw. den Kernen infizierter Zellen. Nach Auftrennung der Präparationen in der SDS-PAGE und Transfer auf CN-Membranen erfolgte die Immunfärbung mit dem Antikörper E23F12. Es zeigte sich, daß das von diesem Antikörper erkannte 130 K Polypeptid erwartungsgemäß in behüllten Partikeln, aber auch in Präparationen von Kapsiden aus dem Zytoplasma bzw. aus Zellkernen infizierter Zellen vorhanden war (Abb. 16). In Abhängigkeit von der Präparation traten jeweils 8 bis 12 weitere Banden mit höherer elektrophoretischer Mobilität auf, die ebenfalls ein von dem monoklonalen Antikörper erkanntes Epitop trugen.

5.1.3.7 Kompetitionsversuche

Es sollte ferner untersucht werden, ob die Epitope der Antikörper C2D8 und E23F12 überlappen bzw. identisch sind. Zu diesem Zweck ließ ich zunächst einen unmarkierten und danach einen biotinylierten Antikörper an eine ELISA-Testplatte adsorbieren und wies gebundenes biotinyliertes Maus-IgG mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex nach. In Vorversuchen wurde die Konzentration der Antikörper C2D8 und E23F12 ermittelt, die notwendig ist, um alle jeweiligen Epitope abzusättigen. Es stellte sich heraus, daß die Bindung

des einen Antikörpers die Reaktion des jeweils anderen nicht inhibiert. Beide Antikörper erkennen demnach verschiedene, sich nicht beeinflussende Epitope.

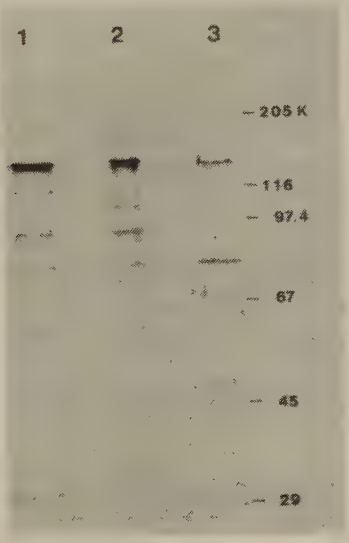


Abb.16: Immunoblot-Antigenerkennung in Präparationen gereinigter Viren und Kapside

Aus Zytoplasma, Kernen bzw. Zellkulturüberständen infizierter Vero-Zellen gewonnene, in Saccharose-Gradienten gereinigte BHV-2-Virionen bzw. -Kapside wurden der SDS-PAGE unterzogen, die aufgetrennten Polypeptide auf CN-Membranen überführt und mit dem Antikörper E23F12 immungefärbt.

Bahn 1: Kapside aus dem Zytoplasma infizierter Vero-Zellen
Bahn 2: Kapside aus Kernen infizierter Vero-Zellen
Bahn 3: Überstandsvirus

5.1.4 Eigenschaften der gegen Antigene von HSV gerichteten monoklonalen Antikörper

In weiteren Versuchsansätzen untersuchte ich die Eigenschaften von 23 gegen HSV-Glykoproteine gerichteten monoklonalen Antikörpern, die alle im

Immunoblot und teilweise in Zell-ELISA und Neutralisationstest eingesetzt wurden.

Sechs gegen gB und ein gegen gD gerichteter monoklonaler Antikörper wurden im Zell-ELISA getestet (Tab. 7). Alle Antikörper reagierten mit Antigenen, die auf der Zellmembran HSV-1-infizierter glutardialdehyd-fixierter Zellen exprimiert waren. In formaldehyd-fixierten Zellen erkannten die gegen gB gerichteten Antikörper nach Detergenz-Aufschluß diffus im Zytoplasma lokalisiertes Antigen. Der gD-spezifische Antikörper (HD-1) band stärker an Determinanten, die membranassoziiert zu sein schienen.

Das gleiche Reaktionsmuster ergab sich auf HSV-2 infizierten Vero-Zellen. Allerdings lag der Titer des Antikörpers 1397-3 für die Erkennung intrazellulären Antigens hier erheblich niedriger (HSV-1: ≥1: 1600; HSV-2: 1:200).

Monoklonaler Antikörper	Reaktivität im ELISA				im Neutralisationstest			
	HSV-1		HSV-2		HSV-1		HSV-2	
	O[1]	I[2]	O	I	m. C'[3]	o. C'[4]	m. C'	o. C'
126-5	+	Z	+	Z	730	176	750	107
233	+	Z	+	Z	25	60	n.t.[5]	n.t.
336-3	+	Z	+	Z	-	-	-	-
1163-3	+	Z	+	Z	-	-	-	-
1316-3	+	Z	+	Z	-	-	-	-
1373-3	+	Z	+	Z	-	-	-	-
1397-3	+	Z	+	Z	-	-	-	-
HD-1	+	Z	+	Z	> 10000	>10000	>10000	> 10000

Tab. 7: Reaktivität der gegen HSV gerichteten monoklonalen Antikörper in ELISA und Neutralisationstest.

[1] Erkennung von Oberflächenantigenen glutardialdehyd-fixierter infizierter Vero-Zellen. (+): positive Reaktion.

[2] Erkennung von zytoplasmatischem Antigen (Z) in formaldehyd-fixierten infizierten Vero-Zellen.

[3] Neutralisationstest in Gegenwart von Komplement.

[4] Neutralisationstest ohne Komplement.
Reziproke Titer für 50 % Plaquereduktion sind angegeben. Alle Antikörper lagen als Aszitesflüssigkeit vor. (-): keine Neutralisation.

[5] nicht getestet

Im Neutralisationstest führten zwei der gB-spezifischen und der gegen gD gerichtete Antikörper zur Inaktivierung von HSV-1 und -2, wobei der Titer des letztgenannten Antikörpers die der anderen mindestens um das 13 - 400fache überstieg. In Gegenwart von Kaninchenkomplement war nur mit dem Antikörper 126-5 eine deutliche Verstärkung der Neutralisation zu messen. Ein Titeranstieg auf den vierfachen Wert und höher gilt als signifikant.
Schließlich prüfte ich die gegen HSV-Glykoproteine gerichteten monoklonalen Antikörper auf ihre Reaktivität im immunoblot. Vier von ihnen reagierten positiv, drei davon erkannten eine Bande bei 108 K (gB), und einer reagierte mit gD (59 K).

5.2 Kreuzreaktionen

Meine Experimente bauten auf den Ergebnissen anderer Untersucher auf, die Kreuzreaktionen zwischen HSV-1 und HSV-2, sowie die Verwandtschaft dieser Viren mit BHV-2 ermittelt hatten (STERZ *et al.*, 1973; PAULI u. LUDWIG, 1977; KILLINGTON *et al.*, 1978; LUDWIG *et al.*, 1978; NORRILD *et al.*, 1978 b; YEO *et al.*, 1980; SNOWDEN *et al.*, 1985; SNOWDEN u. HALLIBURTON, 1985). Die Daten, die SNOWDEN *et al.* (1985) über eine entferntere Antigenverwandtschaft zwischen HSV und SHV-1 veröffentlichten, veranlaßten mich, die von mir hergestellten SHV-1-spezifischen monoklonalen Antikörper in die Versuche mit einzubeziehen. Alle genannten Autoren führten ihre Experimente jedoch mit polyvalenten Seren durch, während ich im folgenden über die kreuzreagierenden Eigenschaften monoklonaler Antikörper gegenüber den erwähnten vier Herpesviren berichte.

5.2.1 ELISA und IFT

Sechs SHV-1-spezifische monoklonale Antikörper (s. Tab. 3) wurden im Zell-ELISA auf BHV-1-, BHV-2-, EHV-1-, HSV-1- und HSV-2-infizierten Zellen eingesetzt. Es fiel auf, daß der Antikörper Q8H12 sowohl mit Epitopen auf der Oberfläche als auch mit zytoplasmatischem Antigen BHV-2-, HSV-1- und HSV-2-infizierter, nicht jedoch mit BHV-1- bzw. EHV-1-infizierten Zellen reagierte. Alle übrigen gegen SHV-1-Antigene gerichteten monoklonalen Antikörper führten nur im homologen System zu einer Färbung.

In einer weiteren Versuchsreihe untersuchte ich die BHV-2-spezifischen monoklonalen Antikörper im Zell-ELISA und im IFT auf BHV-2-, HSV-1- und HSV-2-infizierten Zellen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt, in die ich zu Vergleichszwecken die Daten über die Reaktivität der Antikörper im homologen System (vgl. Tab. 4, 5) miteinbezogen habe. Zell-ELISA und IFT lieferten grundsätzlich vergleichbare Ergebnisse, allerdings war die Empfindlichkeit des ELISA höher. Im homologen System (BHV-2-infizierte Zellen) traten überhaupt keine Abweichungen der Befunde in den beiden Tests auf. Dagegen färbte Antikörper E18E3 beim Einsatz im ELISA und im IFT Oberfläche und Zytoplasma BHV-2-infizierter Zellen an, während beide Reaktionen mit HSV-1-infizierten Zellen im ELISA negativ ausfielen und sich lediglich im Zytoplasma HSV-2-infizierter Zellen eine spezifische Färbung zeigte. Im indirekten Immunfluoreszenztest reagierte der Antikörper dagegen mit zytoplasmatischem Antigen in HSV-1-infizierten Vero-Zellen, nicht jedoch mit HSV-2-infizierten Zellen. Der Antikörper F1D3 reagierte im IFT mit HSV-2-infizierten Zellen, war aber im ELISA negativ.

Keiner der Antikörper erkannte im ELISA Antigene, die in oder auf der Oberfläche BHV-1- oder SHV-1-infizierter Zellen exprimiert waren.

Die gegen HSV-1 gerichteten monoklonalen Antikörper reagierten mit Ausnahme des Antikörpers HD-1 im ELISA mit Oberflächen- und zytoplasmatischem Antigen HSV-1-, HSV-2- und BHV-2-infizierter Zellen, nicht dagegen mit Antigenen von BHV-1 und EHV-1.

Monoklonale Antikörper		ELISA BHV-2 0[1]	ELISA BHV-2 I[2]	ELISA HSV-1 0	ELISA HSV-1 I	ELISA HSV-2 0	ELISA HSV-2 I	IFT BHV-2 0	IFT BHV-2 I	IFT HSV-1 0	IFT HSV-1 I	IFT HSV-2 0	IFT HSV-2 I
C2D8	A	+	Z	+	Z	+	Z	+	Z	+	Z	+	Z
E1D3	A	+	Z	+	Z	-	-	+	Z	+	Z	+	Z
E18B11	A	+	K,(Z)	+	Z	-	-	+	K,(Z)	+	Z	-	-
E18E3	A	+	Z	-	-	-	Z	+	Z	-	Z	-	-
E22F12	A	+	K,(Z)	+	K,(Z)	+	K,(Z)	+	K,(Z)	+	K,(Z)	+	K,(Z)
E23F12	A	+	K,(Z)	+	K,(Z)	+	K,(Z)	+	K,(Z)	+	K,(Z)	+	K,(Z)
126-5	B	+	Z	+	Z	+	Z	+	Z	+	Z	+	Z
233	B	+	Z	+	Z	+	Z	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
336-1	B	+	Z	+	Z	+	Z	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
1163-3	B	+	Z	+	Z	+	Z	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
1373-3	B	+	Z	+	Z	+	Z	+	Z	+	Z	+	Z
1397-3	B	+	Z	+	Z	+	Z	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
HD-1	B	-	-	+	Z	+	Z	-	-	+	Z	+	Z
Q8H12	C	+	Z	+	Z	+	Z	+	Z	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

Tab. 8 Kreuzreaktivität monoklonaler Antikörper gegen BHV-2 (A), HSV-1(B), und SHV-1 (C) in Zell-ELISA und IFT

[1] Erkennung von Oberflächenantigenen glutardialdehyd-fixierter infizierter Vero-Zellen. (+): positive Reaktion; (-): negativ.

[2] Erkennung von zytoplasmatischem (Z) bzw. kernassoziiertem Antigen (K) in formaldehyd-fixierten infizierten Vero-Zellen. (-): negative Reaktion. (n.t.): nicht getestet

5.2.2 Kreuzneutralisation

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse interessierte mich die Frage, ob auch Kreuzneutralisationen beobachtet werden konnten. Die Ergebnisse der Experimente gibt Tabelle 9 wieder. Es fiel auf, daß die Antikörper C2D8 und E18E3 beide Typen des HSV neutralisierten. Die Titer für 50 % Plaquereduktion lagen in Größenordnungen, die der Titerhöhe gegen BHV-2 entsprachen. E23F12 erhöhte die Infektionstiter der eingesetzten Inokula von HSV-1 und HSV-2 in ähnlicher Weise wie bereits bei BHV-2 beschrieben. In Gegenwart von Kaninchenkomplement waren die Antikörper E22F12 und E23F12 in der Lage,

HSV-1 und -2 zu inaktivieren, sie verhielten sich also wie im homologen System. Für die monoklonalen Antikörper, die der IgG-Sub klasse 1 angehörten (C2D8, E1D3, E18E3) gilt hinsichtlich ihres Komplement-Bindungsvermögens das bereits unter 5.1.3.3 gesagte. E18B11 (gegen BHV-2 gerichtet) und Q8H12 (gegen SHV-1 gerichtet) zeigten keinerlei neutralisierende Eigenschaften gegenüber BHV-2, HSV-1 oder HSV-2.

Monoklonale Antikörper		IgG Subklasse	Biologische Aktivität in Gegenwart von Komplement BHV-2	HSV-1	HSV-2	ohne Komplement BHV-2	HSV-1	HSV-2
C2D8	A	1	63	43	62	65	31	67
E1D3*	A	1	25	-	-	28	-	-
E18B11	A	2a	-	-	-	-	-	-
E18E3	A	1	188	49	26	75	75	26
E22F12	A	2b	22	90	13	-	-	-
E23F12	A	2b	60	38	8	-	-	-
126-5	B	2b	-	730	750	-	176	107
233	B	n.t.	-	25	60	-	n.t.	n.t.
1163-3	B	n.t.	-	-	-	-	-	-
1316-3	B	n.t.	-	-	-	-	-	-
1373-3	B	n.t.	86	-	-	108	-	-
HD-1	B	n.t.	-	> 10000	> 10000	-	> 10000	> 10000
Q8H12*	C	1	-	-	-	-	-	-

Tab. 9: Kreuzneutralisation monoklonaler Antikörper gegen BHV-2 (A), HSV (B) und SHV-1 (C)

Es sind reziproke Titer für 50 % Plaquereduktion angegeben. (-): kein neutralisierender Effekt; (e): Infektionstiter höher als in Kontrollen, die FKS bzw. einen nicht neutralisierenden monoklonalen Antikörper enthielten. Die ELISA-Titer der Aszites-Flüssigkeiten lagen zwischen $1\text{-}2 \times 10^{-6}$.

* Von diesen Hybridoma-Linien standen keine antikörperhaltigen Aszitesflüssigkeiten zur Verfügung. Daher wurde konzentrierter Kulturüberstand eingesetzt (ELISA-Titer: 2×10^{-5}).

(n.t.): nicht getestet

5.2.3 Untersuchungen im Immunoblot

Immunfärbungen von antigenbeladenen CN-Streifen ergaben, daß die Antikörper C2D8, E1D3, E10B11, E18E3, E22F12, E23F12 in diesem Test nicht mit Lysaten HSV-1-infizierter Zellen reagierten. Das Ergebnis war unabhängig davon, ob die Lysate der HSV-1 infizierten Zellen unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisiert worden waren. Die gleichen Antikörper banden ebenfalls nicht an Antigene BHV-1-, EHV-1- bzw. SHV-1-infizierter Zellen, die ich unter reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE unterzogen hatte.

Auch die gegen SHV-1 gerichteten monoklonalen Antikörper kreuzreagierten im Immunoblot nicht mit Antigenen, die aus BHV-2-, HSV-1-, HSV-2- bzw. EHV-1-infizierten Zellen isoliert worden waren.

Die gegen Glykoproteine des HSV-1 erzeugten monoklonalen Antikörper 1163-3, 336-3 und 1316-3 reagierten dagegen mit CN-Streifen, auf die unter reduzierenden Bedingungen SDS-PAGE separierte Proteine aus BHV-2-infizierten Zellen elektrotransferiert worden waren. Der erstgenannte Antikörper erkannte eine Doppelbande bei 130 - 140 K, die anderen ein 130 K Polypeptid (Abb. 17).

Setzte man den Antikörper 1163-3 bei der Immunfärbung von CN-Membranen ein, auf die in verschiedenen Lysaten enthaltene Proteine nach SDS-PAGE übertragen worden waren, so ergab sich, daß in NP-40/DOC-Lysaten der Stämme BMV und TVA ein Protein bei 140 K, ein weiteres bei 130 K und ein Spektrum von Banden im Bereich zwischen 105 und 115 K erkannt wurden (Abb.18). Im SDS-Nachlysat des NP-40/DOC-Lysats von BMV-infizierten Vero-Zellen fand sich nur eine unscharfe positiv reagierende Zone im Bereich von 105 bis 110 K. Kernpräparationen von Zellen, die mit dem einen oder dem anderen Virusstamm infiziert worden waren, enthielten im einen Fall Banden bei 130, 116 und 104 K (TVA), im anderen bei 116, 110, 104 und 100 K (BMV). Demgegenüber reagierte der gegen BHV-2 hergestellte monoklonale Antikörper E23F12 in jeder der Präparationen mit der 130 K Bande, lediglich in den

SDS-haltigen Lysaten trat eine Doppelbande bei 130 K auf (zur Herstellung der Lysate vgl. Fließschema II).

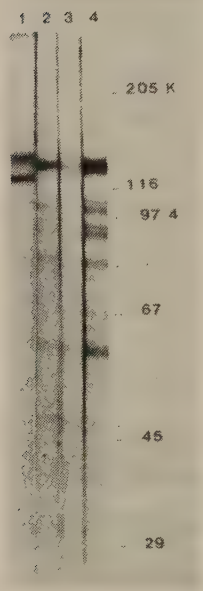


Abb. 17: Reaktion gegen gB (HSV) gerichteter monoklonaler Antikörper mit BHV-2-spezifischen Polypeptiden

Lysate BHV-2-infizierter Zellen wurden der SDS-PAGE unterzogen, die aufgetrennten Proteine auf CN-Membranen übertragen und Streifen der Membran mit gB (HSV) spezifischen monoklonalen Antikörpern immungefärbt.

Bahn 1: 1163-3; Bahn 2: 1316-3;
Bahn 3: 336-1 Bahn 4: E23F12 (Positiv-Kontrolle)

5.2.4 Immunpräzipitationen

In den folgenden Experimenten setzte ich die bereits beschriebene Kombination von Immunpräzipitationen und Immunoblot ein, um die von den kreuzreagierenden monoklonalen Antikörpern erkannten Polypeptide in den heterologen Systemen zu bestimmen.

Ein polyvalentes Kaninchenserum mit Spezifität für das Glykoprotein gB (HSV) (anti-Ag11), ein SHV-1-spezifischer, verschiedene gegen gB (HSV) gerichtete und mehrere das 130 K Glykoprotein des BHV-2 erkennende monoklonale Antikörper wurden in Immunpräzipitationen mit Lysaten aus BHV-2 (Stamm BMV), HSV-1 und HSV-2-infizierten Vero-Zellen eingesetzt.

Nach Auftrennung der aus Lysaten BHV-2-infizierter Zellen immunpräzipitierten Polypeptide im SDS-Polyacrylamidgel und Elektrotransfer auf eine CN-Membran erfolgte eine Immunfärbung unter Verwendung des

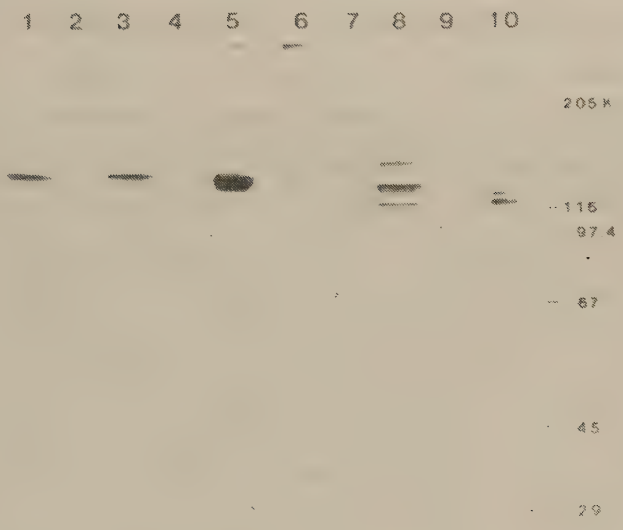


Abb. 18: Antigenerkennung in Lysaten BHV-2 infizierter Zellen durch die Antikörper E23F12 und 1163-3

Lysate BHV-2 (Stämme BMV, TVA) infizierter Vero- bzw. GBK-Zellen wurden der SDS-PAGE unterzogen, die separierten Polypeptide auf CN-Membranen überführt und mit den monoklonalenAntikörpern (Bahnen 1-5: E23F12; Bahnen 6-10: 1163-3) immungefärbt.

Bahnen 1 und 6: NP-40/DOC-Lysat, BMV,Vero
Bahnen 2 und 7: SDS-Nachlysat des NP-40/DOC-Lysates, BMV, Vero
Bahnen 3 und 8: NP-40-Lysat, BMV, GBK
Bahnen 4 und 9: SDS-Lysat, TVA, GBK-Zellkerne
Bahnen 5 und 10: SDS-Lysat, BMV, GBK-Zellkerne

monoklonalen Antikörpers E23F12. Dabei zeigte sich, daß alle eingesetzten Seren bzw. monoklonalen Antikörper (anti-Ag-11, die gB-spezifischen Antikörper und der Antikörper gegen SHV-1) ein Protein mit einem Molekulargewicht von 130 K infizierter Zellen präzipitiert hatten, das mit dem BHV-2 spezifischen Antikörper E23F12 reagierte (Abb. 19). Kontrollen mit

Lysaten uninfizierter Zellen enthielten dieses Antigen nicht. Dieser Versuch belegte zunächst nur, daß Antikörper mit Spezifität für gB (HSV) und ein SHV-1-spezifischer Antikörper mit einem Glykoprotein des BHV-2 kreuzreagierten. Daher war zu klären, ob auch die gegen Proteine des BHV-2 gerichteten monoklonalen Antikörper das Glykoprotein gB des HSV präzipitierten. Dazu wurden diese monoklonalen Antikörper in Immunpräzipitationen mit Lysaten HSV-1-infizierter Zellen eingesetzt. Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE und Elektrotransfer auf Cellulosenitrat erfolgte eine Immunfärbung mit dem gegen gB gerichteten Antikörper 1316-3. Die Versuche zeigten, daß die Antikörper C2D8, E1D3 und E18E3 ein Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 108 K präzipitiert hatten (Abb. 20). Dieses Polypeptid repräsentiert das Glykoprotein gB des HSV-1. Demgegenüber präzipitierte der Antikörper E23F12 zwei Proteine, die bei 85 und 90 K bandeten und ebenfalls mit 1316-3 reagierten. Der gegen SHV-1 gerichtete monoklonale Antikörper Q8H12, der im ELISA mit HSV-1-infizierten Zellen kreuzreagiert hatte, präzipitierte das gB-1 nicht (Abb. 20). Gleiches galt für einen monoklonalen Antikörper (817-3), der seine Spezifität für ein BHV-2-Antigen beim Herstellen von Aszitesflüssigkeit verloren hatte.

Die Antikörper C2D8, E1D3, E23F12, E18B11 und E18E3 präzipitierten aus Lysaten HSV-2-infizierter Zellen ein Polypeptid von 110 K, das ebenfalls mit dem gB-spezifischen monoklonalen Antikörper 1316-3 reagierte (Abb. 21). Die vier letztgenannten Immunglobuline fällten zusätzlich in unterschiedlicher Menge das 95 K Protein.

Wurden Immunpräzipitationen mit Q8H12 und Lysaten BHV-2-infizierter Zellen durchgeführt und die Präzipitate dem zuvor beschriebenen Verfahren (SDS-PAGE, Elektroblot) unterzogen, so ergab sich, daß Q8H12 in der Lage war, das BHV-2 spezifische 130 K Protein, das mit E23F12 anfärbbar war, zu präzipitieren (Abb. 19, Bahn 4, rechter Teil).

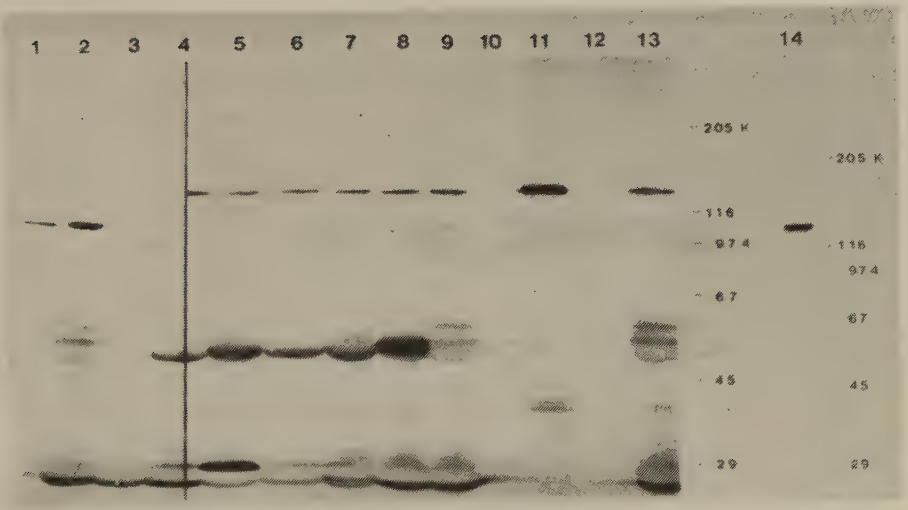


Abb. 19: Kreuzreaktivität monoklonaler Antikörper und Seren mit einem BHV-2 spezifischen Protein

In Immunpräzipitationstests mit verschiedenen Seren und monoklonalen Antikörpern gewonnene Antigene aus HSV-1 (Bahnen 2, 3) bzw. BHV-2 (Bahnen 4-9,13,14) infizierten Vero-Zellen wurden in der SDS-PAGE analysiert, auf CN-Membranen transferiert und mit den Antikörpern 1316-3 (Bahnen 1-4) oder E23F12 (Bahnen 4-14) immungefärbt.

Bahn	1: HSV-1; Lysat	Bahn	5: 1163-3	Bahn	10: leer
	2: 1316-3		6: 1397-3		11: BHV-2, Lysat
	3: E23F12		7: 336-1		12: HSV-Lysat
	4: Q8H12		8: 1312-4*		13: 1316-3
			9: 126-5		14: anti-Ag11

(*): nicht weiter untersucht

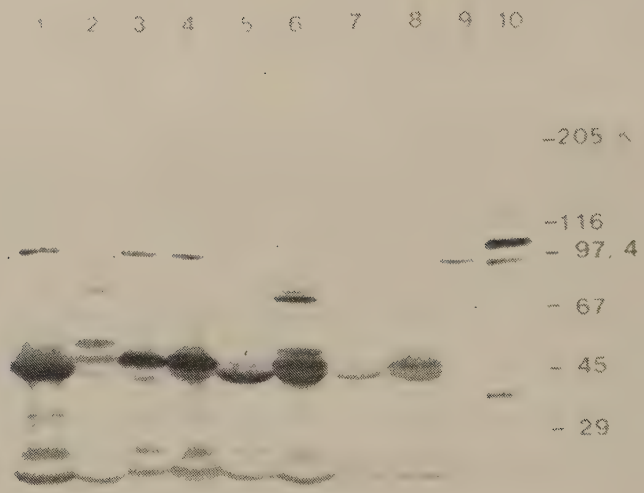


Abb. 20: Kreuzreaktivität monoklonaler Antikörper mit gB-1

In Immunpräzipitationstests mit verschiedenen gegen das 130 K Glykoprotein des BHV-2 gerichteten monoklonalen Antikörpern gewonnene Antigene aus HSV-1-infizierten Vero-Zellen wurden in der SDS-PAGE analysiert, auf CN-Membranen überführt und mit dem Antikörper 1316-3 immungefärbt.

Bahn 1: C2D8	Bahn 5: E23H2	Bahn 8: 817-3
2: E23F12	6: E23F12	9: HSV-1, Lysat
3: E1D3	7: Q8H12	10: gerein. HSV-1
4: E18E3		

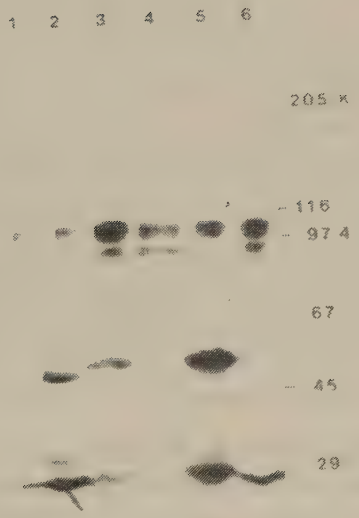


Abb. 21: Kreuzreaktivität monoklonaler Antikörper mit gB-2

HSV-2-Antigene wurden mit verschiedenen gegen das 130 K Glykoprotein des BHV-2 gerichteten monoklonalen Antikörpern präzipitiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf CN-Membranen überführt und mit dem Antikörper 1316-3 immungefärbt.

Bahn 1: C2D8	Bahn 4: E18B11
2: E1D3	5: E18E3
3: E23F12	6: E22F12

5.2.5 Lokalisierung kreuzreagierender Antigene in infizierten Zellen

Mit Hilfe mehrerer Detergenzien, die in unterschiedlichem Maße fähig sind, in Membranen integrierte Proteine zu solubilisieren, wollte ich ermitteln, in welchen Kompartimenten der BHV-2-infizierten Zelle sich das von den Antikörpern C2D8, E1D3 und E23F12 erkannte Antigen ansammelt. Da NP-40 als eine der mildesten Chemikalien unter den üblichen Detergenzien (s. 4.10.7.1) gilt, wurden infizierte Zellen mit einer 0,5 % Lösung behandelt (vgl. Fließschema II). Dabei lösten sich die Zellmembranen, jedoch schienen die Kerne lichtoptisch intakt zu bleiben. Demgegenüber vermochte eine Kombination von 0,5 % NP-40 und 0,5 % Natriumdesoxycholat (DOC) sowohl Zellmembran als auch Kernhülle zu zerstören. Durch Ultrazentrifugation (1 h, 35 000 UpM, SW 50.1) ließ sich ein erheblicher Anteil unlöslicher Proteine pelletieren, die durch Behandlung mit 1 % Natrium-Dodecylsulfat (SDS) weitgehend in Lösung gebracht werden konnten.

Der Immunoblot-Vergleich von Lysaten BHV-2-infizierter Vero-Zellen, die unter Verwendung von 0,5 % NP-40 oder einer Kombination von 0,5 % NP-40 und 0,5 % DOC hergestellt worden waren, mit dem SDS-Nachlysat des Pellets, das nach Ultrazentrifugation des NP-40/DOC-Lysats entstanden war, ergab, daß mit NP-40 und NP-40/DOC vergleichbare Mengen des 130 K Antigens solubilisiert worden waren (Abb. 22, Bahnen 1 - 3). Demgegenüber tauchte im SDS-Nachlysat des NP-40/DOC-Lysats (s. 4.10.7.1) statt des gewohnten 130 K Proteins eine Doublette auf (Molekulargewichte 130 K und 125 K). Zusätzlich erkannte Polypeptide mit höherer elektrophoretischer Mobilität unterschieden sich in den verschiedenen Lysat-Präparationen: während die Bandenspektren von NP-40- und NP-40/DOC-Lysaten nur geringfügig in der Farbintensität einzelner Proteine differierten, fanden sich im SDS-Nachlysat weitere mit E23F12 reagierende Polypeptide mit anderen Molekulargewichten. Wurde das NP-40-Lysat infizierter Vero-Zellen ultrazentrifugiert (1 h, 35 000 UpM, SW 50.1) und das Pellet mit NP-40 und DOC enthaltendem Puffer nachextrahiert, fand sich in dieser Fraktion nur eine geringe Menge des 130 K Proteins.

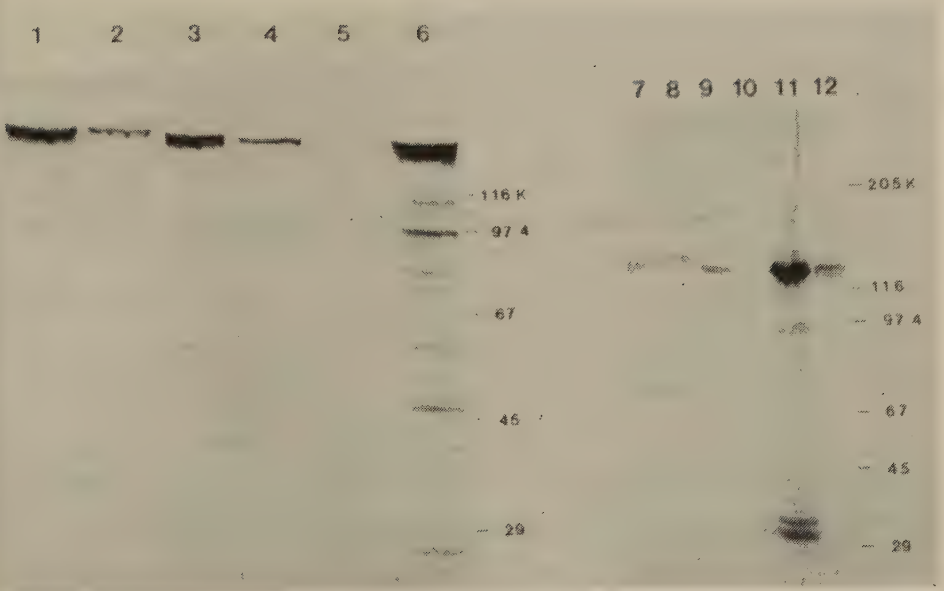


Abb. 22: Löslichkeit des BHV-2 spezifischen 130 K Glykoproteins in verschiedenen Detergenzien
Auf verschiedene Weise solubilisierte Antigenpräparationen BHV-2 (Stamm BMV) infizierter Vero- oder GBK-Zellen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf CN-Membranen übertragen und mit dem monoklonalen Antikörper E23F12 immungefärbt.

Bahn 1: Vero, NP-40
2: Vero, NP-40/DOC-Nachlysat des NP-40 Extraktes
3: Vero, SDS-Nachlysat des NP-40/DOC-Extraktes
4: GBK, NP-40
5: GBK, NP-40/DOC-Nachlysat des NP-40-Extraktes
6: GBK, SDS-Nachlysat des NP-40/DOC-Extraktes
7: Vero, NP-40
8: GBK, NP-40
9: Vero, NP-40/DOC
10: GBK, NP-40/DOC
11: Vero, SDS
12: GBK, SDS

Anmerkung: in den Bahnen 1-3 sind verschiedene Lysate infizierter Vero-, in den Bahnen 4-6 Lysate von GBK-Zellen verglichen. Die Bahnen 7 - 12 stellen in gleicher Weise gewonnene Lysate von Vero- und GBK-Zellen jeweils gegenüber.

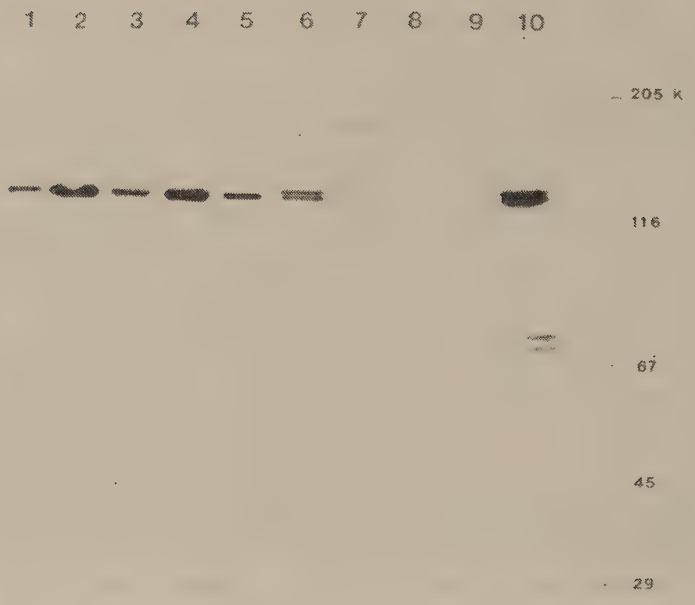


Abb. 23: Vergleich von Immunpräzipitaten aus NP-40/DOC und SDS-Lysaten BHV-2-infizierter Zellen

Mit monoklonalen Antikörpern präzipitierte Antigene BHV-2 infizierter Zellen wurden der SDS-PAGE unterzogen, auf CN überführt und mit dem Antikörper E23F12 immungefärbt. Die Bahnen 1-5 enthalten Immunpräzipitate aus NP-40/DOC-Lysaten, die Bahnen 6-10 solche aus SDS-Nachlysaten der NP-40/DOC-Extraktion.

Bahnen 1 und 6: C2D8
2 und 7: E23F12
3 und 8: E1D3
4 und 9: E18B11
5 und 10: E18E3

Lysierte BHV-2-infizierte GBK-Zellen ergaben folgendes Bild: in NP-40-lysaten fand sich weniger Antigen als in vergleichbaren Vero-Kulturen. Die Nachextraktion des Ultrazentrifugationspellets mit NP-40/DOC solubilisierte im Gegensatz zur SDS-Nachlyse der NP-40/DOC-Extraktion kein weiteres Antigen.

Beim Vergleich der Lysate BHV-2-infizierter GBK- und Vero-Zellen fiel auf,

daß Antigen aus GBK-Zellen gegenüber in gleicher Weise gewonnenem Antigen aus Vero-Zellen eine etwas geringere elektrophoretische Mobilität aufwies und in letzterem Falle zudem als Doppelbande auftrat. Die Proteine, die in NP-40 und DOC enthaltenden Lysaten nachgewiesen wurden, zeigten ähnliche Unterschiede hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Mobilität, während in den SDS-Extrakten beider Zellen eine Doppelbande in gleicher Höhe erschien (Abb. 22, Bahnen 7 -12).

Immunpräzipitate, die unter Verwendung der monoklonalen Antikörper C2D8, E1D3, E18B11 E18E3 und E23F12 mit SDS-Nachlysaten der NP-40/DOC-Extraktion gewonnen worden waren, enthielten im Gegensatz zu Ansätzen, bei denen NP-40/DOC-Lysate als Antigen diente, alle die Doppelbande bei 125/135 K, jedoch hatten die Antikörper E1D3 und E18B11 nur geringe oder keine nachweisbaren Mengen von Proteinen höherer elektrophoretischer Mobilität präzipitiert, die mit E23F12 reagieren (Abb. 23).

Für weitere Immunpräzipitations-Experimente wurden Präparationen infizierter Zellen bzw ihrer Bestandteile eingesetzt, die in Abwesenheit von Detergenzien oder erst nach der Antigen-Antikörperreaktion mit Hilfe von Detergenzien gewonnen worden waren. Gereinigte Zellkerne und infizierte Zellen wurden mit den Antikörpern C2D8, E23F12 und E1D3 inkubiert, mit NP-40/DOC- bzw. NP-40-haltigen Pufferlösungen lysiert und die Antigen-Antikörper-Komplexe mit anti-Maus-IgG-Agarose"beads" präzipitiert. In weiteren Immunpräzipitationen setzte ich detergenzfrei hergestellte Zytoplasmaextrakte und NP-40/DOC-Lysate gereinigter Zellkerne ein. Alle Präzipitate wurden der SDS-PAGE unterzogen, auf CN-Filter übertragen und mit dem Antikörper E23F12 immungefärbt. Dabei ergab sich, daß alle drei Antikörper an das 130 K Polypeptid auf der Oberfläche infizierter Zellen gebunden hatten. E23F12 präzipitierte allerdings wesentlich geringere Mengen als die beiden anderen Antikörper. In der Zytoplasma-Fraktion enthaltenes Antigen, das sich wieder als Doppelbande zeigte, konnte ebenfalls mit allen drei Antikörpern nachgewiesen werden. Lediglich die Antikörper E23F12 und E1D3 banden Spuren des Antigens, das auf der Oberfläche von Zellkernen exprimiert

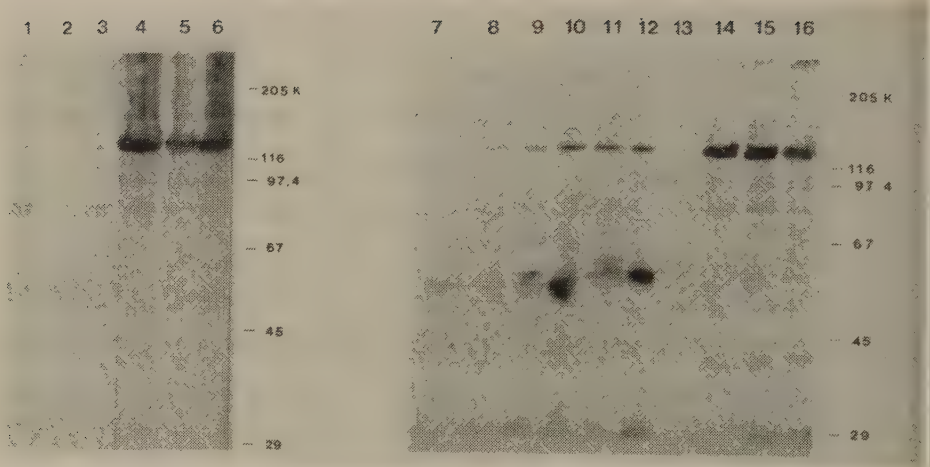


Abb. 24: Reaktivität der BHV-2 spezifischen Antikörper mit Antigenpräparationen aus verschiedenen Zellkompartimenten

In der Zellmembran, im Zytoplasma, auf der Oberfläche und in Kernen infizierter Vero-Zellen vorhandene Antigene wurden durch Immunpräzipitation gewonnen, der SDS-PAGE unterzogen, auf CN-Membranen übertragen und mit dem Antikörper E23F12 immungefärbt.

Bahn 1: Zelloberflächenantigen, präzipitiert mit C2D8
2: " " " E23F12
3: " " " E1D3
4: nicht präzipitiertes Antigen der Präparation Bahn 1
5: " " " " " Bahn 2
6: " " " " " Bahn 3
7: Kernoberflächen-Antigen, präzipitiert mit C2D8
8: " " " " E23F12
9: " " " " E1D3
10: zytoplasmatisches Antigen, " " C2D8
11: " " " " E23F12
12: " " " " E1D3
13: gereinigtes BHV-2
14: kernassoziiertes Antigen, " " C2D8
15: " " " " E23F12
16: " " " " E1D3

war, während wiederum alle drei Antikörper das 130 K Polypeptid aus Lysaten dieser Zellkerne präzipitierten (Abb. 24).

In entsprechender Weise wurden Immunpräzipitationen der drei genannten Antikörper mit HSV-1-infizierten Zellen durchgeführt. Die Präzipitate wurden nach der Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel auf mit CN-Membranen transferiert und mit dem gB (HSV) spezifischen monoklonalen Antikörper 336-1 immungefärbt (Abb. 25).

Dabei stellte sich heraus, daß alle drei Antikörper aus Lysaten, die nur NP-40 oder NP-40 und DOC enthielten, mehrere Polypeptide präzipitiert hatten, die mit 336-1 reagierten und unscharf ineinander übergehende Banden im Molekulargewichtsbereich von 98 bis 120 K bildeten. Unter diesen Banden waren zwei mit Molekulargewichten von 105 und 108 K prominent. Aus verdünnten SDS-haltigen Extrakten präzipitierten nur die Antikörper C2D8 und E1D3 sehr geringe Mengen Antigen, gleiches gilt für das SDS-Nachlysat des Ultrazentrifugationspellets der NP-40-Lyse. Wenn HSV-1-infizierte Zellen mit den Antikörpern inkubiert, die Zellen mit NP-40 lysiert und entstandene Antigen-Antikörper-Komplexe mit Anti-Maus-IgG-Agarose"beads" gefällt wurden, fand sich bei der Analyse der Präzipitate des Antikörpers C2D8 ein ähnliches Ergebnis wie in den oben beschriebenen NP-40-Lysaten. E23F12 hatte dagegen allenfalls geringe Mengen Antigen im Molekulargewichtsbereich von 95 K präzipitiert. Wurden gereinigte Kerne HSV-1-infizierter Zellen mit den Antikörpern inkubiert, mit NP-40/DOC lysiert und die Antikörper mit anti-Maus-IgG-"beads" gefällt, so fand sich in diesen Präparationen kein mit Antikörper 336-1 anfärbbares Antigen. Gleiches gilt für Immunpräzipitationen mit dem ohne Detergenz hergestellten Zytoplasma-Extrakt HSV-1-infizierter Zellen (Abb. 26).

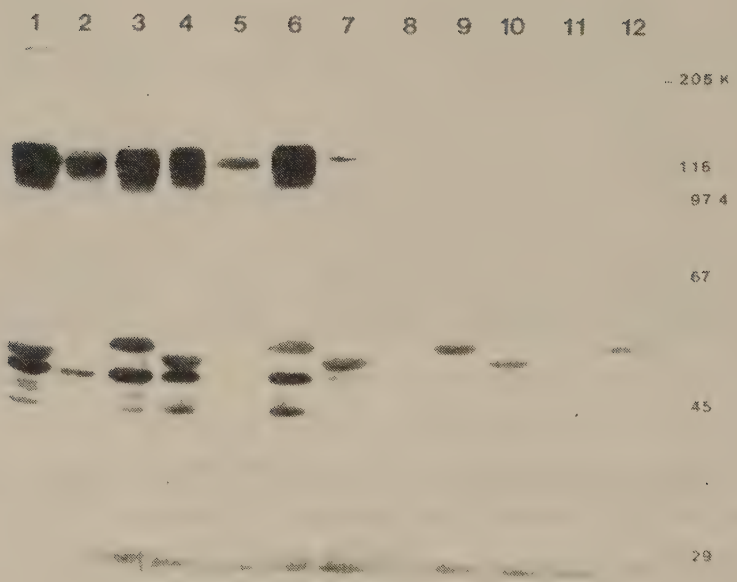


Abb. 25: Vergleich von Immunpräzipitaten aus NP-40/DOC- und SDS-Lysaten HSV-1-infizierter Zellen

Mit monoklonalen Antikörpern präzipitierte Antigene HSV-1 infizierter Zellen wurden der SDS-PAGE unterzogen, auf eine CN-Membran überführt und mit dem Antikörper 1163-3 immungefärbt.

Bahn	1: NP-40/DOC-Lysat;	präzip. Antikörper:	C2D8
	2: "	"	E23F12
	3: "	"	E1D3
	4: NP-40-Lysat	"	C2D8
	5: "	"	E23F12
	6: "	"	E1D3
	7: SDS-Lysat, verdünnt	"	C2D8
	8: "	"	E23F12
	9: "	"	E1D3
	10: SDS-Nachlysat, NP-40 Extr.	"	C2D8
	11: "	"	E23F12
	12: "	"	E1D3

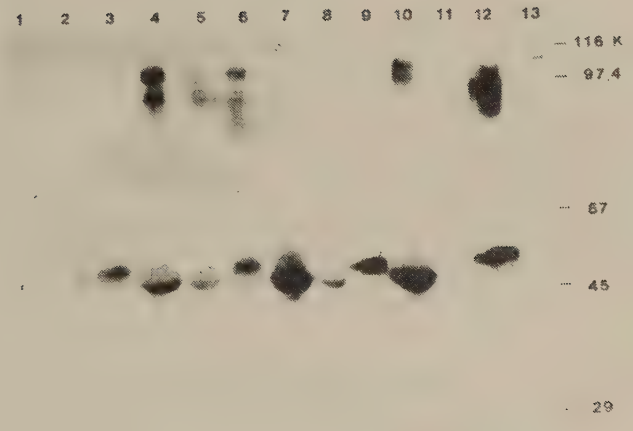


Abb. 26: Reaktivität der BHV-2 spezifischen Antikörper mit Antigenpräparationen aus verschiedenen Kompartimenten HSV-1-infizierter Zellen

In der Zellmembran, im Zytoplasma, auf der Kernoberfläche und in Kernen infizierter Vero-Zellen vorhandene Antigene wurden durch Immunpräzipitation gewonnen, der SDS-PAGE unterzogen, auf CN-Membranen übertragen und mit dem Antikörper 336-1 immungefärbt.

Bahn	1:	Kernoberflächenantigen, präzipitiert mit	C2D8
	2:	" " "	E23F12
	3:	" " "	E1D3
	4:	Zelloberflächenantigen, " "	C2D8
	5:	" " "	E23F12
	6:	" " "	E1D3
	7:	zytoplasmatisches Antigen, " "	C2D8
	8:	" " "	E23F12
	9:	" " "	E1D3
	10:	gereinigtes HSV-1	
	11:	kernassoziiertes Antigen " "	C2D8
	12:	" " "	E23F12
	13:	" " "	E1D3

5.2.6 Zeitliches Auftreten der kreuzreagierenden Antigene in BHV-2- und HSV-1-infizierten Zellen

Mit IFT und Immunoblots wurde das Auftreten des gB-1 und des korrespondierenden BHV-2-Antigens in infizierten Zellen verfolgt.
Im Immunfluoreszenztest trat in BHV-2-infizierten, formaldehyd-fixierten Kulturen erstmalig 3-4 h nach der Infektion mit BHV-2 eine zytoplasmatische Fluoreszenz in Erscheinung, 5 h p.i. war kernassoziiertes Antigen nachweisbar und nach einer weiteren Stunde reagierte auch die Oberfläche infizierter Zellen positiv (Tab. 10).

Lokalisation	Stunden *post infectionem*										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	24
Zytoplasma	-	-	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+
Zellkern	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Zellmembran	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Tab. 10: Auftreten des 130 K Glykoproteins in BHV-2 infizierten Vero-Zellen

Infizierte Zellen wuden nach den in der Tabelle angegebenen Inkubationszeiten formaldehydfixiert und im IFT eingesetzt. Dabei fand zum Nachweis von Epitopen im Zytoplasma und auf der Zellmembran der Antikörper C2D8 Verwendung. Kernassoziiertes Antigen wurde mit E23F12 nachgewiesen.

Für den Einsatz in Immunoblots vorgesehene BHV-2 oder HSV-1-infizierte Vero-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit NP-40, NP-40/DOC bzw. SDS (bei HSV-1) lysiert, die solubilisierten Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Cellulosenitrat überführt und mit den monoklonalen Antikörpern E23F12 bzw. 336-1 immungefärbt.
Mit dem monoklonalen Antikörper E23F12 ließ sich in Lysaten uninfizierter Zellen kein Antigen demonstrieren. Kulturen, die eine Stunde nach der

Infektion mit BHV-2 geerntet wurden, enthielten drei Proteine mit Molekulargewichten von 130, 78 bzw 75 K, die mit dem genannten Antikörper reagierten. Sie repräsentieren vermutlich virale Proteine, die mit dem Inokulum aufgebracht worden waren. In zwei, drei und vier Stunden p.i. lysierten Zellkulturen wurden ähnliche Situationen angetroffen wie eine Stunde nach der Infektion. 6 h p.i. erschien zusätzlich eine schwache Bande bei 135 K, die sich zwei Stunden später ebenso intensiv anfärben ließ wie das 130 K Polypeptid und nach zwei weiteren Stunden in Breite und Farbintensität dominierte. Zellen, die 24 h p.i. geerntet wurden, enthielten neben den bereits beschriebenen Banden mindestens 6 weitere Proteine, die ein vom Antikörper E23F12 erkanntes Epitop trugen (Abb. 27).

Während die Proteine uninfizierter Zellen den monoklonalen Antikörper 336-1 nicht banden, solubilisierten alle drei Lysispufferlösungen zwei schwache Banden bei 108 und 98 K aus HSV-1-infizierten Zellen, die 1 h p.i. geerntet worden waren. 2 h p.i. traten 3 - 4 Banden im Molekulargewichtsbereich von 98 bis 108 K und eine weitere bei 50 K auf. Von der sechsten Stunde p.i. an fanden sich neben den stark angefärbten Banden im Bereich von 98 bis 108 K in Abhängigkeit vom solubilisierenden Detergenz Proteine mit höherer elektrophoretischer Mobilität, mit denen der Antikörper 336-1 reagierte. Ab 8 h p.i. färbte sich die Bande bei 108 K intensiver als die übrigen erkannten Proteine, 10 und 24 h nach der Infektion nahm die Menge erkannten Antigens nochmals erheblich zu. In den SDS-haltigen Lysaten fiel die stärkere Färbung eines Polypeptids bei 99 K und eine Abnahme der Farbintensität der 108 K Bande zur Stunde 10 auf (Abb. 28).

5.2.7 Immunelektronenmikroskopie

Abschließend sollte durch Markierungsversuche mit monoklonalen Antikörpern und Ferritin-Konjugaten an *in situ* fixierten BHV-2 (BMV) bzw. HSV-1-infizierten Vero-Zellen bestätigt werden, daß die BHV-2-spezifischen

Antikörper an Bestandteile der Virushülle binden. Dabei mußte ich feststellen, daß BHV-2-infizierte Zellen nicht in dem für elektronenoptische Untersuchungen erforderlichen Maß Viruspartikel ausgeschleust hatten, während in zahlreichen Zellkernen größere Ansammlungen von Kapsiden zu beobachten waren. Demgegenüber gelang eine spezifische Markierung von extrazellulärem Herpes simplex Virus mit den Antikörpern C2D8, E1D3 und eine schwache Markierung mit E23F12 (Abb. 29).

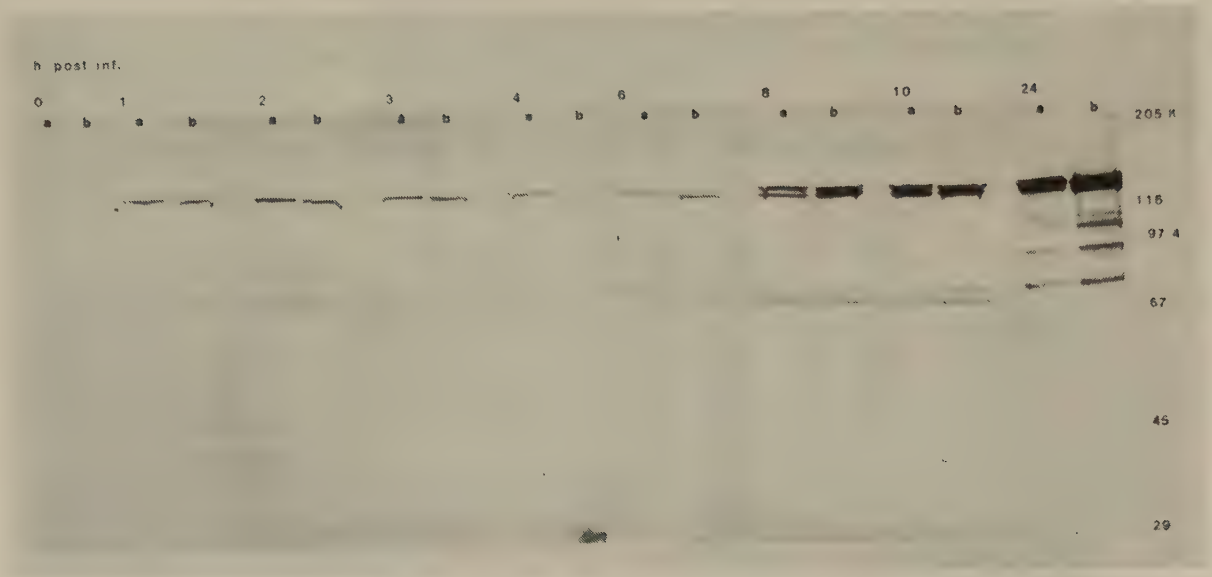


Abb. 27: Zeitliches Auftreten des 130 kD Glykoproteins in BHV-2-infizierten Zellen

Vero-Zellen wurden zu den in der Abbildung angegeben Zeiten nach der Infektion mit NP-40 bzw. NP-40/DOC lysiert (Bahnen a und b zu jeder Stunde), der SDS-PAGE unterzogen und auf eine CN-Membran übertragen. Eine Immunfärbung mit dem Antikörper E23F12 schloß sich an.

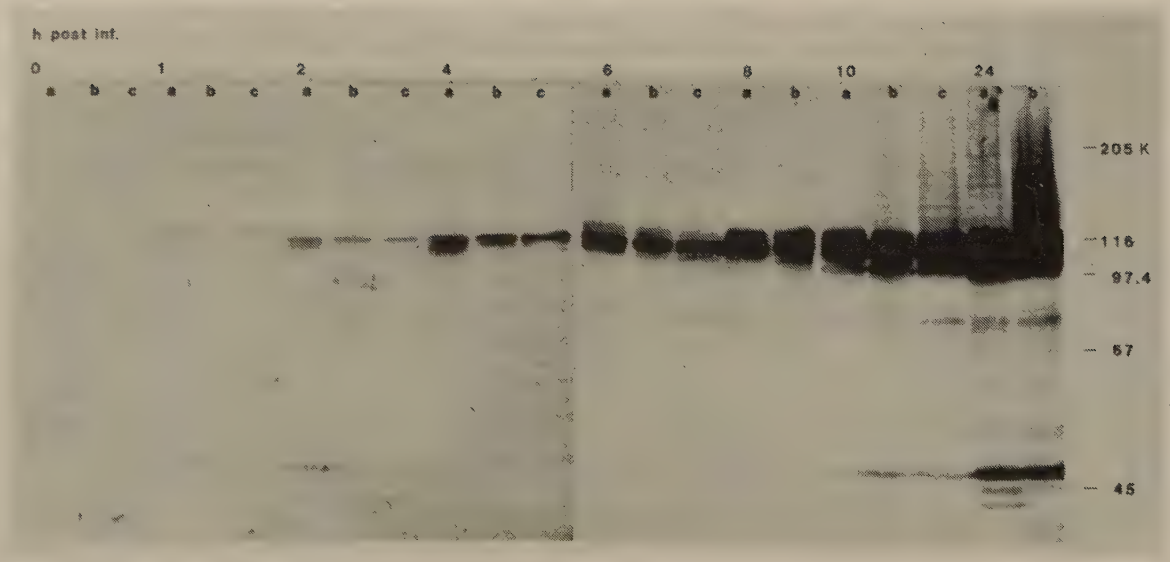


Abb. 28: Zeitliches Auftreten des Glykoproteins gB in HSV-1-infizierten Zellen

Vero-Zellen wurden zu den in der Abbildung angegeben Zeiten nach der Infektion mit NP-40, NP-40/DOC bzw. SDS lysiert (Bahnen a, b bzw. c zu jeder Stunde), der SDS-PAGE unterzogen und auf eine CN-Membran übertragen. Eine Immunfärbung mit dem Antikörper 336-1 schloß sich an.

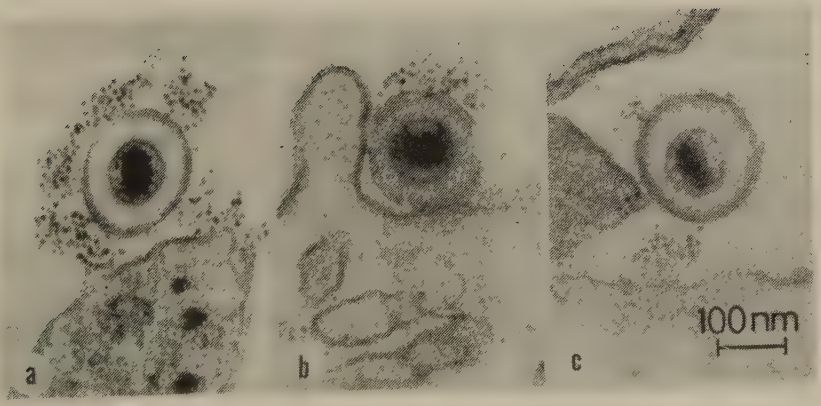


Abb. 29: Immunelektronenmikroskopie mit indirekter Immunferritin-markierung
HSV-1-infizierte Zellen wurden *in situ* mit monoklonalen Antikörpern, anschließend mit anti-Maus-IgG-Ferritin-Konjugat behandelt, in Epon-Harz eingebettet und ultradünngeschnitten.

a): C2D8 b) E1D3 c): E23F12

Monoklonale Antikörper (M), Seren (S)	gerichtet gegen	Epitop-lokalisierung	Mol.-gew. der erkannten Proteine [K]	Kreuzreaktionen mit
Anti-Ag-11 (S)	gB (HSV)	n.t.	108	BHV-2 (NT[1], IPT[2])
AS 8 (S)	BHV-2	n.t.	diverse	HSV-1, -2 (NT)
S 297 (S)	BHV-2	n.t.	diverse	n.t.
C2D8 (M)	BHV-2	Z	130	HSV (E[3], IFT[4], NT, IPT)
E1D3 (M)	BHV-2	Z[5]	130	HSV-1 (E, IFT, IPT) HSV-2 (IFT, IPT)
E18B11 (M)	BHV-2	K[6], (Z)	130	HSV-1 (E, IFT, IPT)
E18E3 (M)	BHV-2	Z	130	HSV-1 (IFT, NT, IPT) HSV-2 (E, NT, IPT)
E22F12 (M)	BHV-2	K, (Z)	130	HSV (E, IFT, NT, IPT)
E23F12 (M)	BHV-2	K, (Z)	130	HSV (E, IFT, NT, IPT)
HD-1 (M)	gD (HSV)	Z	59	keine
09A5 11 (M)	SHV-1	Z	135	keine
09D5 11 (M)	SHV-1	Z	118,100,82,62	keine
Q6A5 (M)	SHV-1	Z	unbekannt	keine
Q6A7 (M)	SHV-1	K, Z	135	keine
Q8H12 (M)	SHV-1	K	135	BHV-2 (E, IPT) HSV (E)
Q17C11 (M)	SHV-1	Z	135	keine
Q21G6 (M)	SHV-1	Z	135	keine
126-5 (M)	gB (HSV)	Z	108	BHV-2 (E, IFT, IPT)
233 (M)	gB (HSV)	Z	108	BHV-2 (E, IPT)
336-3 (M)	gB (HSV)	Z	108	BHV-2 (E, IPT, IB[7])
1163-3 (M)	gB (HSV)	Z	108	BHV-2 (E, IPT, IB)
1316-3 (M)	gB (HSV)	Z	108	BHV-2 (E, IPT, IB)
1373-3 (M)	gB (HSV)	Z	108	BHV-2 (E, IFT, NT)

Tab 11: Zusammenfassung der Eigenschaften der Seren und monoklonalen Antikörper

[1] Neutralisationstest
[2] Immunpräzipitationstest
[3] ELISA
[4] Immunfluoreszenztest
[5] Erkennung von zytoplasmatischem Antigen
[6] Erkennung von kernassoziiertem Antigen
[7] Immunoblot

6 DISKUSSION

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper wurden die Antigenverwandtschaften von SHV-1, BHV-2, HSV-1 und -2 untersucht. Dabei beschränkte ich mich auf die kreuzreagierenden Polypeptide der Virushülle.

6.1 Monoklonale Antikörper gegen SHV-1

Mit Hilfe der Hybridoma-Technik konnte ich monoklonale Antikörper isolieren, die in SHV-1-infizierten Zellen ebenso wie auf gereinigten Virionen ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 135 K erkannten. Keiner der Antikörper neutralisierte das Virus. Das von ihnen erkannte Polypeptid lag in den beiden untersuchten SHV-1-Stämmen "DEK" und "DESSAU" vor, es scheint nicht mit dem Glykoprotein gp130 identisch zu sein, das BUND (1983) nur bei Wildstämmen, nicht jedoch im Impfstamm "Dessau" nachweisen konnte. Generell gelang es mit keinem der untersuchten Antikörper, Impfstamm- von Wildtyp-Virus zu unterscheiden.

Einer der monoklonalen Antikörper präzipitiert zudem vorwiegend ein mit ^{3}H-Glucosamin nicht markierbares 118 K Protein und in geringerem Maße ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 62 K. Diese beiden Antigene tragen jedoch auch das Epitop für den Antikörper Q8H12, der hauptsächlich das 135 K Glykoprotein präzipitierte. Diese Befunde bestätigen und erweitern Erkenntnisse von Hampl und Mitarbeitern (1984), die einen monoklonalen Antikörper beschrieben, der einen Komplex bestehend aus drei Glykoproteinen (130, 98 und 62 K) und einem nicht glykosylierten Polypeptid (115 K) präzipitierte. Gewisse Differenzen der Molekulargewichtsangaben im Vergleich zu meinen Resultaten sind mit Modifikationen der PAGE-Bedingungen erklärbar. Das unterschiedliche Präzipitationsmuster der Antikörper Q9D5 und Q8H12

läßt den Schluß zu, daß sie zwei verschiedene Epitope erkennen. Diese Annahme stützt auch der Befund ihres unterschiedlichen Färbeverhaltens im ELISA. Dabei scheinen jedoch beide Antigen-Determinanten auf dem 115 K Polypeptid repräsentiert zu sein, wobei allerdings nur 09D5 das Antigen präzipitiert. Dies würde bedeuten, daß auf dem "nativen" Protein nur das Epitop für 09D5, nicht aber die Erkennungsstelle für den Antikörper Q8H12 zugänglich ist. Diese wird jedoch nach Denaturierung (Erhitzen, SDS-PAGE) aufgedeckt. Das 135 K Glykoprotein läßt sich mit dem Antikörper 09A5 nicht präzipitieren, möglicherweise weil es das Epitop für diesen Antikörper nicht besitzt, oder da die Determinante nicht zugänglich ist. Auf diesem Polypeptid ist also offenbar die Determinante für 09D5 nicht zugänglich. Ob die von den monoklonalen Antikörpern erkannten Polypeptide (135, 118, 82 und 62 K) in einem Vorläufer-Produkt-Verhältnis zueinander stehen, müssen weitere Experimente zeigen.

Obwohl einige Berichte über die Antigenverwandtschaft von Oberflächenproteinen bei SHV-1, HSV und BHV-2 vorliegen (WATSON *et al.*, 1967; SNOWDEN *et al.*, 1985) gelang die Identifizierung des verwandten Antigens bisher nicht. Der Antikörper Q8H12 gibt somit erstmalig Hinweise darauf, daß ein 135 K Glykoprotein des SHV-1 mit dem 130 K Glykoprotein von BHV-2 Antigen-Determinanten gemeinsam hat. Der Befund, daß SHV-1 und BHV-2 sowohl im Immunpräzipitationstest als auch im ELISA kreuzreagierten, während sich bei HSV die Reaktion auf den ELISA beschränkte, deutet an, daß die entsprechenden Domänen hinsichtlich ihrer Struktur bzw. Funktion in den einzelnen Virussystemen unterschiedlich sein konnten. Dem Einwand, daß die Kreuzreaktion durch den monoklonalen Antikörper über die Saccharidseitenketten der Glykoproteinen stattfindet, kann mit dem Argument begegnet werden, daß der entsprechende Antikörper sein Antigen auch in Präparationen findet, die aus verschiedenen Zellinien stammen und daher in ihren Glykosylierungsmustern unterschiedlich sind (PEREIRA *et al.*, 1981).

6.2 Virusstrukturproteine und hauptimmunogene Komponenten des BHV-2

Die Analysen gereinigter Viruspartikel und Kapside ergaben, daß BHV-2 ähnlich wie andere Herpesviren (ROIZMAN und BATTERSON, 1985) über schätzungsweise 30 - 50 Virusstrukturproteine verfügt, von denen bis zu 25 mit dem Lectin Concanavalin A reagieren, also wahrscheinlich glykosyliert sind. Genauere Angaben über Zahl und Charakteristika der in den Viruspartikeln enthaltenen Polypeptide erscheinen aufgrund des methodischen Fehlers der Untersuchungstechnik nicht sinnvoll. Die Methode der Wahl für die Bestimmung der Virusstrukturproteine wäre die Markierung der viralen Proteine bzw. Glykane mit radioaktiven Aminosäuren oder Zuckern bei einer Ein-Schritt-Vermehrung des Virus gewesen, jedoch ließ sich diese Technik wegen der niedrigen BHV-2-Titer (vgl. STERZ, 1973) nicht durchführen.
Immunoblots mit Schaf-Hyperimmunseren ergaben, daß etwa 14 Polypeptide mit Molekulargewichten von 28 bis 160 K als hauptimmunogene Komponenten des BHV-2 angesehen werden können.

6.3 Monoklonale Antikörper gegen BHV-2

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten monoklonalen Antikörper gegen BHV-2 reagierten mit der Oberfläche von Zellen, die mit dem Virus infiziert worden waren, und präzipitierten ein virusspezifisches Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 130 K, das sich auch in Präparationen gereinigter Virionen fand. Dieses Polypeptid induziert neutralisierende Antikörper, deren Virus-inaktivierende Eigenschaften nicht auf einer Hemmung der Penetration beruhen. Der Vergleich der mit verschiedenen Methoden (Neutralisationstest, ELISA, Immunfluorezenztest, Immunpräzipitationstest) erzielten Ergebnisse

zwingt zu dem Schluß, daß alle Antikörper unterschiedliche Epitope erkennen. Kompetitionsexperimente mit den Antikörpern C2D8 und E23F12 deuten darauf hin, daß sich diese Immunglobuline bei der Bindung an ihr Antigen nicht beeinträchtigen und ihre Epitope räumlich getrennt sind. Mit zwei voneinander unabhängigen Techniken konnte gezeigt werden, daß die monoklonalen Antikörper im Inneren infizierter Zellen entweder nur zytoplasmatisches Antigen oder präferentiell kernassoziiertes Antigen erkennen. Da sie jedoch ein und dasselbe Protein aus Lysaten infizierter Zellen präzipitieren, kann geschlossen werden, daß die Konformation des Polypeptids von dem Zellkompartiment bestimmt wird, in dem es sich befindet

Immunpräzipitationen mit BHV-2-Antigenpräparationen ergaben, daß neben dem 130 K Glykoprotein mehrere Proteine mit niedrigerem Molekulargewicht gefällt worden waren, die das Epitop des Antikörpers E23F12 trugen. Offenbar präzipitiert jeder Antikörper neben dem 130 K Glykoprotein ein spezifisches Bandenmuster, das durch die Erkennung von Vorläufermolekülen oder Produkten eines proteolytischen Abbaus des "Hauptantigens" zustande kommt (PEREIRA *et al.*, 1982).

Von vergleichenden SDS-PAGE-Analysen, bei denen Lysate BHV-2-infizierter Zellen unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt wurden, hatte ich mir nähere Aufschlüsse über die Struktur des von den monoklonalen Antikörpern erkannten Antigens erhofft. Jedoch sorgten die Resultate dieser Experimente eher für Verwirrung als für Klärung. Zwar ist die Interpretation der Ergebnisse möglich, wenn sich auch keine Deutung widerspruchslos mit den anderen Untersuchungen vereinbaren läßt.

Lysate BHV-2-infizierter Zellen, die unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt worden waren, erbrachten im Immunoblot unterschiedliche Bandenmuster bei zwei Antikörpern, die im Immunpräzipitationstest dasselbe Antigen präzipitieren. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß ein auf dem 43 - 50 K Protein repräsentiertes Epitop des Antikörpers C2D8 unter reduzierenden

Bedingungen zerstört wird. Das Auftreten von 2 Banden bei 170 und 130 K unter nichtreduzierenden Bedingungen bei der Immunfärbung mit E23F12 läßt verschiedene Interpretationsmöglichkeiten zu. Zum einen kann man vermuten, daß das 43-50 K Protein, das die Antigen-Determinante für C2D8 trägt, über Disulfidbrücken mit dem 130 K Glykoprotein verbunden ist, wodurch das 170 K Protein entstünde. Sicher ist, daß die von E23F12 erkannte Domäne sowohl auf dem 170 K als auch auf dem 130 K Polypeptid vorhanden ist, wobei man annehmen muß, daß sie auf dem 170 K Protein in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol zerstört wird. Die von C2D8 auf dem 43-50 K Protein detektierten Determinanten werden ihrerseits ebenfalls in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol zerstört, ein Befund, der nahelegen könnte, daß dieses Protein über interne Disulfidbrücken verfügt, die das Epitop von C2D8 mit bilden helfen.

Andererseits muß damit gerechnet werden, daß sich unter nichtreduzierenden Bedingungen die Mobilität der Polypeptide beträchtlich ändert, so daß Unterschiede im relativen Molekulargewicht möglicherweise nur vorgetäuscht werden. Mit weiteren Versuchen könnte sicherlich auch geklärt werden, ob das unter nichtreduzierenden Bedingungen von C2D8 erkannte 43-50 K Protein nicht nur ein Bruchstück des 130 K Polypeptids ist, das von dem Antikörper besonders gut erkannt wird.

Mit Hilfe verschiedener Methoden untersuchte ich die Lokalisation der Epitope einer Auswahl monoklonaler Antikörper in der Zelle. Die mit dem Zell-ELISA bzw. dem IFT erzielten Ergebnisse belegten bereits, daß einige Antikörper zytoplasmatische , andere kernassoziierte Epitope erkannten. Mit Immunpräzipitationen ließ sich beweisen, daß die jeweils eingesetzten Antikörper dasselbe BHV-2-Glykoprotein präzipitierten.

Aus den Ergebnissen der Immunpräzipitationstests war weiterhin ersichtlich, daß in SDS-haltigen und NP-40-Lysaten von GBK-Zellen statt des einfachen

130 K Glykoproteins eine Doppelbande auftrat. Ein Polypeptid dieser Doublette ist offenbar aufgrund seiner Hydrophobizität so fest in andere Strukturen des Kerns (bei GBK-Zellen möglicherweise auch der Zellmembran und des Zytoplasma) integriert, daß es lediglich mit sehr aggressiven Detergenzien solubilisiert werden kann. Grundsätzlich scheint die Desintegration des 130 K Glykoproteins aus Membranen von GBK-Zellen erheblich schwieriger zu sein als bei Vero-Kulturen, da sich der überwiegende Teil des Polypeptids nur mit SDS solublisieren ließ. Geringfügige zellabhängige Änderungen der elektrophoretischen Mobilität des leichter löslichen Antigens (mit NP-40 bzw. DOC lysiert) lassen sich mit dem unterschiedlichen "processing" von Glykoproteinen in verschiedenen Zellinien erklären. Zu dieser Hypothese paßt auch, daß die aus beiden Zellinien mit SDS isolierbare Doppelbande jeweils beim gleichen Molekulargewicht lag.

Immunpräzipitationstests, die der Zuordnung der von monoklonalen Antikörpern erkannten Epitope zu bestimmten Zellkompartimenten dienten, zeigten, daß zellmembranständiges Antigen von E23F12 nur schlecht präzipitiert wurde; ein Ergebnis, daß nicht verwundert, da der Antikörper präferentiell mit kernassoziiertem, wahrscheinlich nicht vollständig prozessiertem Antigen (COMPTON u. COURTNEY, 1984) reagiert. Warum die Antikörper C2D8 und E1D3, die im ELISA und IFT kernassoziiertes Antigen nicht erkannten, es aber aus Lysaten gereinigter Zellkerne präzipitierten, ist schwieriger zu verstehen. Möglicherweise liegt das Polypeptid in Kernen durch eine kompaktere Anordnung in einer Konformation vor, bei der die offenkundig von der Sekundär- und Tertiärstruktur abhängigen, daher als "diskontinuierlich" bezeichneten Epitope der Antikörper C2D8 und E1D3 nicht zugänglich bzw. nicht ausgebildet sind. Anscheinend reicht aber bereits das Solubilisieren mit Detergenzien aus, um die für die Erkennung durch die Antikörper notwendige Faltung der Domänen herbeizuführen. Die magere Ausbeute an immunprazipitierbarem Antigen auf der Oberfläche von Zellkernen bestätigte

die ELISA- und IFT-Befunde, die darauf hindeuteten, daß das 130 K Polypeptid eher im Inneren als in der Hülle der Kerne vorkommt.

Aus den Studien zum zeitlichen Auftreten des gB-BHV-2 nach der Infektion ist ersichtlich, daß es sich bei dem Glykoprotein ähnlich wie bei gB-HSV um ein frühes Polypeptid handelt

Die Untersuchung der Kreuzreaktivität BHV-2-spezifischer monoklonaler Antikörper mit HSV erbrachte, daß auch funktionelle Verwandtschaft (Induktion neutralisierender Antikörper) zwischen dem 130 K Protein des BHV-2 und dem Glykoprotein gB von HSV besteht. Damit konnte der aufgrund der Vorarbeiten verschiedener Autoren (NORRILD *et al.*, 1978, LUDWIG *et al.*, 1978, SNOWDEN *et al.*, 1985) naheliegende Verdacht, daß sich die Kreuzneutralisation von BHV-2 und HSV über das 130 K Protein des BHV-2 ereignet, endgültig verifiziert werden.

Wenn die gegen BHV-2 gerichteten Antikörper auch in verschiedenen Experimenten vergleichbare Resultate im homologen und heterologen System (HSV) erbrachten, fand ich doch keine Kreuzreaktion im Immunoblot. Dies bedeutet, daß die entsprechenden kreuzreagierenden Epitope bei BHV-2 und HSV zwar eng verwandt, aber nicht identisch sind.

Neben dem mit Immunpräzipitationen erhobenen Befund, daß verschiedene gegen BHV-2 hergestellte Antikörper fähig waren, das Glykoprotein gB des HSV-1 zu präzipitieren, war von besonderem Interesse, daß der Antikörper E23F12, der in infizierten Zellen vornehmlich mit kernassoziiertem Antigen reagiert, aus Lysaten HSV-1 infizierter Zellen zwei Polypeptide mit 85 und 90 K fällte, die ein gB-spezifisches Epitop trugen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß E23F12 präferentiell mit den von GLORIOSO *et al.* (1983) beschriebenen gB-1-Vorläuferproteinen (angegebene Molekulargewichte: 88 und 92 K, für "reifes" gB-1: 110 K) reagiert. Auf jeden Fall wäre ein Antikörper, der zwischen Vorläufer- und reifen Formen eines Proteins unterscheidet, ein interessantes Hilfsmittel beim Studium der biochemischen Natur sowie der

Lokalisation viraler Polypeptide während Synthese und Reifung in der infizierten Zelle. In diesem Zusammenhang ist auch die Eigenschaft des Antikörpers E23F12 von Bedeutung, die Infektionstiter in Neutralisationstests mit BHV-2 und HSV zu erhöhen, also das Gegenteil von Neutralisation zu bewirken. Da der Antikörper in Gegenwart von Komplement neutralisiert, kann geschlossen werden, daß er mit Determinanten auf der Virushülle reagiert; ein Befund, den im übrigen auch die Immunelektronenmikroskopie bestätigte. Möglicherweise führt das Binden des Antikörpers E23F12 an Vorläuferproteine, die vermutlich in geringer Menge auch im Envelope anzutreffen sind, zu einer Konformationsänderung, die das Polypeptid in eine funktionstüchtige Form überführt.

Immunpräzipitationstests zur Lokalisierung der Epitope der anti-BHV-2 Antikörper in HSV-1-infizierten Zellen zeigten, daß das erkannte Glykoprotein gB mit NP-40 bzw. DOC mehr oder weniger vollständig solubilisiert wurde. Das Polypeptid konnte nur mit dem Antikörper C2D8 von der Zellmembran infizierter Zellen präzipitiert werden, während es sich aus Zytoplasma oder Kernlysaten mit keinem der eingesetzten Antikörper fällen ließ. Die Gründe hierfür mögen darin liegen, daß das zytoplasmatische Antigen in Abwesenheit von Detergenz nicht präzipitierbar, das heißt fest in Membranen integriert war, oder die im Kern erkannten Determinanten könnten als offenkundig diskontinuierliche Epitope (siehe Resultate der Immunoblots) durch die Einwirkung von Detergenz umgefaltet und damit zerstört worden sein.

Im Hinblick auf Zusammenbau und Behüllung der Virionen ist von Interesse, daß das von den monoklonalen Antikörpern erkannte Glykoprotein bei BHV-2 offenbar bereits fest mit dem Kapsid verbunden ist, bevor die Einhüllung an der inneren Kernmembran stattfindet (FALKE et al., 1959). Dieser Schluß wird belegt durch biochemische Untersuchungen an Kapsiden, die aus Kernen infizierter Zellen gewonnen wurden. Zudem unterstützen immunelektronenmikroskopische Befunde an ultradünnen Kryoschnitten diese

Vermutung (S. PIETSCHMANN u. H. GELDERBLOM, persönl. Mitteilung v. 2.2.86). Die Ergebnisse werfen daher erneut die Frage auf, ob bestimmte Glykoproteine selbst Einfluß auf das Envelopement nehmen können (vgl. SPEAR, 1985).

Es deutet alles darauf hin, daß die Konformation des 130 K BHV-2-Glykoproteins wie auch des gB-HSV nach der Freisetzung aus dem Zellkern so verändert ist, daß bestimmte Epitope wesentlich schlechter zugänglich sind als vorher, während andere Antikörperbindungsstellen erst nach dem Übertritt des Proteins ins Zytoplasma aktiviert werden. Diese Hypothese paßt gut zusammen mit dem Befund, daß der Antikörper E23F12, der kernassoziiertes Antigen erkennt, wahrscheinlich präferentiell mit un- oder unterglykosylierten Vorläuferproteinen des gB-1 reagiert. Berücksichtigt man, daß die mit zytoplasmatischem Antigen reagierenden Antikörper ihre Determinanten nach denaturierender und reduzierender Behandlung der Polypeptide nur noch verzögert fanden, könnte man vermuten, daß mit dem Übertritt der Proteine ins Zytosol die Induktion von Antikörpern einhergeht, die sich offenkundig in stärkerem Maße gegen erst im Zuge der Glykoproteinreifung gebildete, diskontinuierliche Epitope richten.

Aufgrund dieser Ergebnisse lassen sich die bisherigen Vorstellungen über die die Synthese der Herpesviren in einem Modell präzisieren, das zum besseren Verständnis der Vorgänge vom Zusammenbau des Kapsids bis zur Ausschleusung des reifen Virions beitragen kann. Es ist ein Mechanismus vorstellbar, bei dem bestimmte Glykoproteine nach dem "assembly" an das Kapsid bzw. Tegument als eine Art Gerüst angefügt werden, das seinerseits wieder die Einhüllung an der inneren Kernmembran bewirkt. Nach dem Übertritt in den perinukleären Spalt reifen die Virionen durch Modifikation der Kohlenhydratseitenketten, ggf. O-glykosidischer Bindungen von Oligosacchariden, Sulfatierung etc. im Golgi-Apparat und werden schließlich ausgeschleust (Abb. 30). Problematisch bleibt lediglich, wie die nach außen ragenden Anteile der Glykoproteine durch die Membran gelangen.

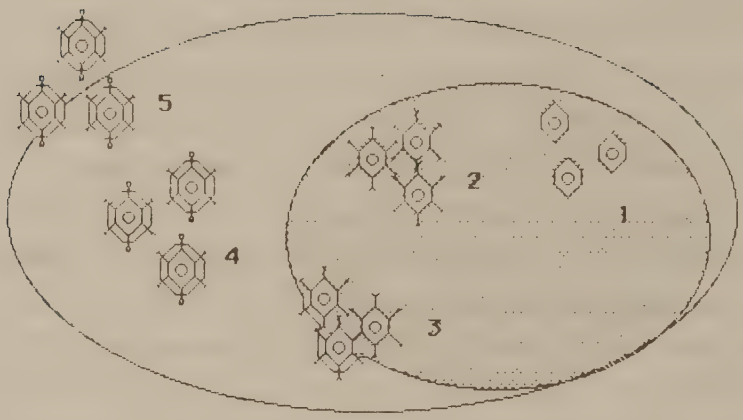


Abb. 30 Modell zur Einhüllung und Reifung von Herpesviren

1 Zusammenbau der Kapside ("assembly") im Zellkern
2 Anfügen bestimmter Glykoproteine
3 Einhüllung der Kapside und "budding" in den perinukleären Spalt
4 Reifung der viralen Glykoproteine im Golgi-Apparat
5 Ausschleusung der Viren

6.4 Monoklonale Antikörper gegen HSV

Die verwendeten Antikörper erkannten Epitope, die den beiden Typen des Herpes simplex Virus gemeinsam sind. Lediglich mit Antikörper 1397-3 ließen sich im ELISA auf HSV-2 infizierten Zellen geringere Titer erzielen, eine Ergebnis, das auf Unterschiede im Epitop des Antikörpers bei den HSV-Typen hindeutet. Alle gegen gB gerichteten monoklonalen Antikörper präzipitierten ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 108 K aus Lysaten HSV-1-infizierter Zellen, jedoch reagierten im Immunoblot nur drei von ihnen mit Antigenen aus infizierten Zellen bzw. gereinigten Virionen.

Die Untersuchungen ergaben, daß alle eingesetzten anti-gB Antikörper zumindest in Immunpräzipitation und ELISA, in einem Fall sogar im Neutralisationstest mit BHV-2 kreuzreagierten. Es stellt sich deshalb die Frage, ob die Verwandtschaft von HSV und BHV-2 tatsächlich mit dem Begriff "Ein-Weg-Kreuzreaktion" charakterisierbar ist. Da jedoch nur ein einziger monoklonaler Antikörper gefunden werden konnte, der gegen gB-HSV gerichtet war, aber BHV-2 schwach neutralisiert, während sich umgekehrt zahlreiche gegen BHV-2 hergestellte Antikörper isolieren ließen, die BHV-2 und HSV inaktivieren, kann man schließen, daß auf dem gB-BHV-2 mehr kreuzreagierende neutralisierende Antikörper induzierende Domänen zugänglich sind als auf dem gB-HSV. Die Tatsache, daß der Antikörper 1163-3 je nach Virusstamm und solubilisierendem Detergenz in verschiedenen Präparationen unterschiedliche Banden erkennt, obwohl er das 130 K Glykoprotein des BHV-2 präzipitiert, könnte darauf hinweisen, daß auch dieser Antikörper im heterologen System vornehmlich mit Nebenprodukten bzw. Vorläuferproteinen des gB-BHV-2 reagiert. Die Epitope des Antikörpers E23F12 scheinen dagegen auf diesen Polypeptiden maskiert zu sein oder ganz zu fehlen.

Der Befund, daß bestimmte Epitope auf Glykoproteinen von BHV-2 und HSV bei völlig verschiedenem Wirtsspektrum dieser Viren kreuzneutralisierende Antikörper induzieren, läßt darauf schließen, daß die von den Immunglobulinen erkannten Domänen außerordentlich wichtige Funktionen tragen müssen. Anderenfalls wäre schwerlich zu erklären, warum es der Natur trotz eines vorauszusetzenden Selektionsdruckes, der auf die Beseitigung dieser Determinanten gerichtetet ist, nicht gelingen konnte, die für das Virus unter Umständen fatalen Antigen-Erkennungsstellen zu beseitigen. Es bietet sich daher an, die Funktion(en) des gB und seiner Analoga bei anderen Herpesviren näher zu ermitteln und nach Möglichkeiten zu suchen, mit der Erzeugung von Antikörpern gegen die entsprechenden Domänen Menschen und Tiere vor Infektionen zu schützen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Das Anliegen dieser Arbeit bestand darin, mit Hilfe monoklonaler Antikörper Daten über kreuzreagierende Proteine in der Virushülle von SHV-1, BHV-2, HSV-1 und HSV-2 zu erheben. Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Monoklonale Antikörper gegen Antigene SHV-1-infizierter Zellen wurden hergestellt, die mit auf der Oberfläche und intrazellulär exprimierten (Zytoplasma, Zellkern) Epitopen reagieren. Ein Teil dieser Antikörper erkennt ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 135 K, das ein Virusstrukturprotein ist. Einer von ihnen kreuzreagiert im ELISA mit BHV-2-, HSV-1- und HSV-2-infizierten Zellen und präzipitiert ein 130 K Glykoprotein aus Lysaten BHV-2-infizierter Kulturen. Dieses Glykan besitzt seinerseits gemeinsame Epitope mit dem Glykoprotein gB des HSV.

2. BHV-2 besteht aus maximal 50 - 55 Virusstrukturproteinen, von denen zahlreiche glykosyliert vorzuliegen scheinen und mindestens 14 als hauptimmunogene Komponenten angesprochen werden können.

3. Eine Serie BHV-2-spezifischer monoklonaler Antikörper reagiert mit Antigenen, die stets auf der Oberfläche infizierter Zellen und bei einem Teil der Immunglobuline im Zytoplasma, beim anderen vorwiegend kernassoziiert vorgefunden werden. Alle Antikörper immunpräzipitieren ein virales Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 130 K, das im Virus wahrscheinlich mit einem weiteren viralen Polypeptid komplexiert vorliegt und erstmalig 3 h p.i. in infizierten Zellen auftritt. Einige der Antikörper inaktivieren BHV-2 und kreuzneutralisieren HSV. Sie reagieren mit Epitopen der Glykoproteine gB-1 und gB-2. Ein Antikörper erkennt vermutlich preferentiell un- oder unterglykosylierte Vorläufer des gB-1.

4. Auch mit Hilfe monoklonaler Antikörper, die gegen Glykoproteine von HSV gerichtet sind, ließ sich zeigen, daß dessen Glykoprotein gB und das 130 K Glykoprotein des BHV-2 über gemeinsame Epitope verfügen. Allerdings wurde nur ein gB-spezifischer Antikörper gefunden, der BHV-2 schwach neutralisierte.

5. Glykoproteinen verschiedener Herpesviren sind bestimmte Epitope gemeinsam, die teilweise kreuzneutralisierende Antikörper induzieren. Dieser Befund läßt den Schluß zu, daß die entsprechenden Antigen-Determinanten während der Evolution stets konserviert wurden. Die Funktion dieser Domänen muß von entscheidender Bedeutung für die Vermehrung zumindest von HSV und BHV-2 sein, da die Epitope trotz des von neutralisierenden Antikörpern ausgehenden Selektionsdruckes während der Entwicklungsgeschichte dieser Viren nicht verschwanden.

SUMMARY

The interest of this thesis was to obtain data about cross-reacting proteins present in the viral envelopes of BHV-2, HSV-1, -2 and SHV-1 using monoclonal antibodies. In detail the following results were achieved:

1. Monoclonal antibodies directed against antigens of SHV-1-infected cells were produced. They react with epitopes expressed on the cell membrane and intracellularly (cytoplasm, nucleus). Some of the antibodies recognize a glycoprotein with a molecular weight (m. w.) of 135 K, which is a structural protein of the virus. One of them cross-reacts with BHV-2-, HSV-1- and HSV-2-infected cells in the ELISA and precipitates a 130 K glycoprotein from lysates of BHV-2-infected cell cultures. This glycan shares common epitopes with the glycoprotein gB of HSV.

2. BHV-2 is composed maximally of 50-55 structural proteins; some of them are apparently glycosylated. At least 14 polypeptides represent major immunogenic components.

3. A series of BHV-2-specific monoclonal antibodies reacts with antigens present on the surface of infected cells. Intracellularly, some of the antibodies detect epitopes in the cytoplasm, others preferentially bind to determinants predominantly associated with the nuclei. They all immunoprecipitate a viral glycoprotein of 130 K m.w. which exists in a complexed form with another viral polypeptide. It appears in cells 3 hours post infection. Some of the antibodies inactivate BHV-2 and cross-neutralize HSV. They react with epitopes on the glycoproteins gB-1 and gB-2. One of them preferentially detects presumably un- or underglycosylated precursors of gB-1.

4. Also with the help of monoclonal antibodies directed against glycoproteins of HSV it could be shown, that its glycoprotein gB and the 130 K glycoprotein of BHV-2 share common epitopes. However, only one gB-specific antibody was found, which was able to neutralize BHV-2 weakly.

5. Glycoproteins of different herpesviruses have certain epitopes in common, some of them induce cross-neutralizing antibodies. This finding allows the conclusion, that the corresponding antigenic determinants have been highly conserved during evolution. The function of these domains must be of crucial importance for the replication of BHV-2 and HSV. Despite the selection pressure caused by neutralizing antibodies this antigenic site did not disappear during the evolution of these viruses.

8 LITERATURVERZEICHNIS *

ACKERMANN, M., R. LONGNECKER, B. ROIZMAN u. L. PEREIRA (1986)
Identification, Properties, and gene location of a novel glycoprotein specified by herpes simplex virus 1.
Virology 150, 207 - 220

BALACHANDRAN, N., D. HARNISH, R. A. KILLINGTON, S. BACCHETTI u. W. E. RAWLS (1981)
Monoclonal antibodies to two glycoproteins of herpes simplex virus type 2.
J. Virol. 39, 438 - 446

BALACHANDRAN, N., D. HARNISH, W. E. RAWLS u. S. BACCHETTI (1982)
Glycoproteins of herpes simplex virus type 2 as defined by monoclonal antibodies.
J. Virol. 44, 344 - 355

BAUCKE, R. B. u. P. G. SPEAR (1979)
Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. V Identification of an Fc-binding glycoprotein.
J. Virol. 32, 779 - 789

*: Zeitschriftentitel-Abkürzungen gemäß:
List of Journals Indexed in Index Medicus.
Bethesda, Md.: National Library of Medicine
bzw.
Serial Sources for the BIOSIS Data Base.
Philadelphia, Pa.: BIOSIS

BEYER, T A., J. E. SADLER, J. I. REARICK, J. C. PAULSON u. R. L. HILL (1981)
Glycosyltransferases and their use in assessing oligosaccharide structure and structure-function relationships.
Adv. Enzymol. 52, 23 - 175

BLOBEL, G , P WALTER, C. N. CHANG, B. M. GOLDMAN, A. H. ERIKSON u. V. R. LINGAPPA (1979)
Translocation of proteins across membranes: The signal hypothesis and beyond.
Symp. Soc. Exp. Biol. 33, 9 - 36

BLUE, W. T. u. G. PLUMMER (1973)
Antigenic relationship amongst 4 herpesviruses
Inf. Immun. 7, 1000 - 1002

BUCKMASTER, E. A., U. GOMPELS u. A. MINSON (1984)
Characterization and physical mapping of an HSV-1 glycoprotein of approximately $115 \cdot 10^3$ molecular weight.
Virology 139, 408 - 413

BUND, K. F. (1983)
Untersuchungen zur Identifizierung, Charakterisierung und Lokalisierung von Pseudorabies Virus-spezifischen Antigenen sowie deren Bedeutung bei der Immunabwehr.
Berlin, Freie Univ., Fachber. Veterinärmed., Diss.

BURNET, F. M., D. LUSH u. A. V. JACKSON (1939)

The relationship of herpes and B virus; immunological and epidemiological considerations.

Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 17, 41 - 51

BURNETTE, W. N. (1981)

"Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium duodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.

Anal. Biochem. 112, 195 - 203

BZIK, D. J., B. A. FOX, N. A. DeLUCA u. S. PERSON (1984)

Nucleotide sequence specifying the glycoprotein gene, gB, of herpes simplex virus type 1.

Virology 133, 301 - 314

CAMPADELLI-FIUME, G. u. F. SERAFINI-CESSI (1985)

Processing of the oligosaccharide chains of herpes simplex virus type 1 glycoproteins.

in: B. ROIZMAN (Hrsg.): The Herpesviruses. Bd. 2.

Plenum Press, New York, London, S. 357 - 382

CAMPADELLI-FIUME, G., L. POLETTI, F. DALL'OLIO u. F. SERAFINI-CESSI (1982)

Infectivity and glycoprotein processing of herpes simplex virus type 1 grown in a ricin-resistant cell line deficient in N-acetylglucosaminyl transferase I.

J. Virol. 43, 1061 - 1071

CASSAI, E., M. SARMIENTO u. P. G. SPEAR (1975)

Comparison of the virion proteins specified by HSV types 1 and 2.

J. Virol. 16, 1327 - 1331

CHOWDHURY, S. I., G. KUBIN u. H. LUDWIG (1986)

Equine herpesvirus induces abortions and paralysis in Lipizzaner stud: a contribution to the classification of equine herpesviruses.

Arch. Virol. (im Druck)

COHEN, G. H., D. LONG u. R. J. EISENBERG (1980)

Synthesis and processing of glycoproteins gD and gC of herpes simplex virus type 1.

J. Virol. 36, 429 - 439

COLE, C. N., D. SOMOLER, E. WIMMER u. D. BALTIMORE (1971)

Defective interfering particles of poliovirus: I. Isolation and physical properties.

J. Virol. 7, 478 - 485

COMPTON, T. u. R. J. COURTNEY (1983)

Virus-specific glycoproteins associated with the nuclear fraction of herpes simplex virus type 1-infected cells.

J. Virol. 49, 594 - 597

DeLUCA, N., D. J. BZIK, V. C. BOND, S. PERSON u. W. SNIPES (1982)

Nucleotide sequences of herpes simplex type 1 (HSV-1) affecting virus entry, cell fusion, and production of glycoprotein gB (VP7).

Virology, 122, 411 - 423

EBERLE, R. u. R. COURTNEY (1980)

gA and gB glycoproteins of herpes simplex virus type 1: Two forms of a single polypeptide.

J. Virol. 36, 665 - 675

EISENBERG, R. J., C. HYDREAN-STERN u. G. H. COHEN (1979)

Structural analysis of precursors and products forms of type-common envelope-glycoprotein D (CP-1 antigen) of herpes simplex virus type 1.

J. Virol. 31, 608 - 620

EISENBERG, R. J., D. LONG, L. PEREIRA, B. HAMPAR, M. ZWEIG, u. G. H. COHEN (1982)

Effect of limited proteolysis of native glycoprotein gD of herpes simplex virus type 1.

J. Virol. 41, 478 - 488

EISENBERG, R. J., D. LONG, R. HOGUE-ANGELETTI u. G. H. COHEN (1984)

Amino terminal sequence of glycoprotein D of herpes simplex virus types 1 and 2.

J. Virol. 49, 265 - 268

EJERCITO, P. M., E. D. KIEFF u. B. ROIZMAN (1968)

Characterization of herpes simplex virus strains in their effect on social behavior of infected cells.

J. gen. Virol. 2, 357 - 364

FALKE, D., R. SIEGERT u. W. VOGELL (1959)

Elektronenmikroskopische Befunde zur Frage der Doppelmembranbildung des Herpes-simplex-Virus.

Arch. gesamte Virusforsch. 9, 484 - 496

ENGELS, M., G. DARAI, H. GELDERBLOM u. H. LUDWIG (1983)

Goat herpesviruses: Biological and physiochemical properties

J. gen. Virol. 64, 2237 - 2247

FREUND, J. (1951)

Effect of paraffin oil and Mycobacteria on antibody formation and sensitization.

Am. J. clin. Pathol. 21, 645

FRINK, R. J., R. J. EISENBERG, G. COHEN u. E. K. WAGNER (1983)

Detailed analysis of the portion of the herpes simplex virus type 1 genome encoding glycoprotein C.

J. Virol. 45, 634 - 647

FULLER, A. O. u. P. G. SPEAR (1985)

Specificities of monoclonal and polyclonal antibodies that inhibit adsorption of herpes simplex virus to cells and lack of inhibition by potent neutralizing antibodies.

J. Virol. 55, 475 - 482

FURLONG, D., H. SWIFT u. B. ROIZMAN (1972)

Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core.

J. Virol. 10, 1071-1074

GALLAHER, W. R., D. B. LEVITAN u. H. A. BLOUGH (1973)

Effect of 2-Deoxy-D-glucose on cell fusion induced by Newcastle desease and herpes simplex viruses.

Virology 55, 193 - 201

GELDERBLOM, H. u. H. SCHWARZ (1976)

Relationship between the Mason-Pfitzer-Monkey virus and HeLa virus. Immunoelectron microscopy.

J. Natl. Canc. Inst. 56, 635 - 637

GERLOFF, R. K., B. H. HOYER u. L. C. Mc LAREN (1962)

Precipitation of radio-labelled poliovirus with specific antibody and antiglobulin.

J. Immunol. 89, 550 - 557

GIBSON, R., R. LEAVITT, S. KORNFELD u. S. SCHLESINGER (1979)

Synthesis and infectivity of vesicular stomatitis virus containing nonglycosylated G protein.

Cell 13, 671 - 679

GLORIOSO, J., M. S. SZCZESIUL, S. D. MERLIN u. M. LEVINE (1983)

Inhibition of glycosylation of herpes simplex virus glycoproteins: Identification of antigenic and immunogenic partially glycosylated polypeptides on the cell surface membrane.

Virology 126, 1 - 18

GODING, J. W. (1983)

Monoclonal antibodies: Principles and practice.

Academic Press, London, New York

GREGERSEN, J.-P. (1983)

Bovines Herpesvirus 1 Untersuchungen über Antigene und ihre Verwandtschaft mit denen des Bovinen Herpesvirus 6 sowie Versuche zur molekularbiologischen Differenzierung von IBR- und IPV-Viren

Berlin, Freie Univ., Fachber. Veterinärmed., Diss.

GREGERSEN, J.-P., G. PAULI u. H. LUDWIG (1985)

Bovine Herpesvirus 1: Differentiation of IBR- and IPV-viruses and identification and functional role of their major immunogenic components.

Arch. Virol. 84, 91 - 103

HAARR, L. u. H. S. MARSDEN (1981)

Two-dimensional gel analysis of HSV type 1-induced polypeptides and glycoprotein processing.

J. gen. Virol. 52, 77 - 92

HAMPL, H., T. BEN-PORAT, L. EHRLICHER, K.-O. HABERMEHL u. A. S. KAPLAN (1984)

Characterization of the envelope proteins of Pseudorabies virus

J. Virol. 52, 583-590

HEINE, J. W., R. W. HONESS, E. CASSAI u. B. ROIZMAN (1974)

The proteins specified by herpes simplex virus: XII. The virion polypeptides of type 1 strains.

J. Virol. 14, 640 - 651

HOLLAND, T. C., S. D. MARLIN, M. LEVINE u. J. GLORIOSO (1983)

Antigenic variants of herpes simplex virus type 1 selected with glycoprotein specific monoclonal antibodies.

J. Virol. 45, 672 - 682

HONESS, R. W. u. D. H. WATSON (1977)

Unity and diversity in the herpesviruses.

J. gen. Virol. 37, 15 - 38

HOPE, R. G. u. H. S. MARSDEN (1983)

Processing of glycoproteins induced by herpes simplex virus type 1: Sulphation and nature of the oligosaccharide linkages.

J. gen. Virol. 64, 1943 - 1953

HONESS, R. W , A. BUCHAN, I. A. HALLIBURTON u. D. H. WATSON (1980)

Recombination and linkage between structural and regulatory genes of herpes simplex virus type 1. Study of the functional organization of the genome.

J. Virol. 34, 716 - 742

JOHNSON, D. C. u. P. G. SPEAR (1982)

Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface and the egress of virions from infected cells.

J. Virol. 43, 1102 - 1112

JOHNSON, D. C. u. P. G. SPEAR (1983)

O-linked oligosaccharides are aquired by herpes simplex virus glycoproteins in the Golgi apparatus.

Cell 32, 987 - 997

KELLER, J. M., P. G. SPEAR u. B. ROIZMAN (1970)

The proteins specified by herpes simplex virus. III. Viruses differing in their effects on the social behavior of infected cells specify different membrane glycoproteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65, 865 - 869

KIEFF, E. D., S. L. BACHENHEIMER u. B. ROIZMAN (1971)

Size, composition and structure of the DNA of subtypes 1 and 2 herpes simplex viruses.

J. Virol. 8, 125 - 132 (1971)

KIEFF, E. D., B. HOYER, S. L. BACHENHEIMER u. B. ROIZMAN (1972)

Genetic relatedness of type 1 and 2 herpes simplex viruses.

J. Virol. 9, 738 - 745

KILLINGTON, R. A., L. NEWHOOK, N. BALACHANDRAN, W. E. RAWLS, u. S. BACCHETTI (1981)

Production of hybrid cell lines secreting antibodies to herpes simplex virus type 2.

J. Virol. Methods 2, 223 - 236

KILLINGTON, R. A., R. E. RANDALL, J. YEO, R. W. HONESS, I. A. HALLIBURTON u. D. H. WATSON (1978)

Observations on antigenic relatedness between viruses of the herpes simplex neutroseron.

In: G. DE-THE, W. HENLE u. F. RAPP (Hrsg.) Oncogenesis and herpesviruses Bd. III/1

IARC Sci. Publ. Nr. 24, Lyon, S. 185 - 194

KILLINGTON, R. A., J. YEO, R. W. HONESS, D. H. WATSON, B. E. DUNCAN, I. W. HALLIBURTON u. J. MUMFORD (1977)

Comparative analyses of the proteins and antigens of five herpesviruses.

J. gen. Virol. 37, 297 - 310

KÖHLER, G. u. C. MILSTEIN (1976)

Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion.

Eur. J. Immunol. 6, 511 - 519

KOUSOULAS, K. G., D. J. BZIK, N. DeLUCA u. S. PERSON (1983)

The effect of ammonium chloride and tunicamycin on the glycoprotein content and infectivity of herpes simplex virus type 1.

Virology 125, 468 - 474

KOUSOULAS, K. G., D. J. BZIK u. S. PERSON (1983)

Effect of the ionophore monensin on herpes simplex virus type 1-induced cell fusion, glycoprotein synthesis and virion infectivity.

Intervirology 20, 56 - 60

KOUSOULAS, K. G., P. E. PELLETT, L. PEREIRA u. B. ROIZMAN (1984)

Mutations affecting conformation or sequence of neutralizing epitopes identified by reactivity of viable plaques segregate from *syn* and *ts* domains of HSV-1(F) gB gene.

Virology 135, 379 - 394

KREIL, G. (1981)

Transfer of proteins across membranes.

Annu. Rev. Biochem. 50, 317 - 348

LÄMMLI, U. K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4.

Nature 227, 680 - 684

LIEBER, M. M. u. G. TODARO (1973)

Spontaneous and induced production of endogenous type-c RNA virus from a clonal line of spontaneously transformed Balb/3T3.

Int. J. Cancer, 11, 616 - 627

LIPSCHÜTZ, B. (1921)

Untersuchungen über die Ätiologie der Krankheiten der Herpesgruppe (Herpes zoster, Herpes genitalis, Herpes febriles).

Arch. dermatol. Forsch. 136, 428 - 482

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDELL (1951)

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265 - 275

LUDWIG, H. (1972)

Untersuchungen am genetischen Material von Herpesviren.

I.Biophysikalisch-chemische Charakterisierung von Herpes-Desoxyribonucleinsäuren.

II. Genetische Verwandtschaft verschiedener Herpesviren.

Med. Microbiol. Immunol. 157, 186 - 238

LUDWIG, H. (1975)

Bovine herpes mammillitis (BHM) virus and its relationship to other herpesviruses.

in: 20th World Veterinary Congress, Thessaloniki, 1975. Kongr. Ber. S. 1318 - 1319

LUDWIG, H. (1983)

Bovine Herpesviruses

in: B. ROIZMAN (Hrsg.): The Herpesviruses. Bd. 2.

Plenum Press, New York, London 1983, S. 135 - 214

LUDWIG, H., H. BECHT u. R. ROTT (1974)

Inhibition of herpes virus-induced cell fusion by Concanavalin A, antisera and 2-Deoxy-D-glucose.

J. Virol. 14, 307 - 314

LUDWIG, H. O., N. BISWAL u. M. BENYESH-MELNICK (1972)

Studies on the relatedness of herpesviruses through DNA-DNA hybridization.

Virology 49, 95 - 101

LUDWIG, H., G. PAULI, B. NORRILD, B. F VESTERGAARD u. M. D. DANIEL (1978)
Immunological characterization of a common antigen present in herpes simplex virus, bovine mammilitis virus and herpesvirus simiae (B virus).
in: G. DE-THE, W. HENLE u. F. RAPP (Hrsg.): Oncogenesis and herpesviruses.
Bd. III/1, IARC Sci. Publ. Nr. 24, Lyon, S. 235 - 241

LUDWIG, H., G. PAULI, H. GELDERBLOM, G. DARAI, H.-G. KOCH, R. M. FLÜGEL, B. NORRILD u. M. D. DANIEL (1983)
B Virus (Herpesvirus simiae).
in: B. ROIZMAN (Hrsg.): The Herpesviruses. Bd. 2.
Plenum Press, New York, London, S. 385 - 428

MANSERVIGI, R., P. G. SPEAR u. A. BUCHAN (1977)
Cell fusion induced by herpes simplex virus is promoted and suppressed by different viral glycoproteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3913 - 3917

MARSHALL, R. D. (1974)
The nature and metabolism of of the carbohydrate-peptide linkage of glycoproteins.
Biochem. Soc. Symp. 40, 17 - 26

MATTHEWS, J. T., G. H. COHEN u. R. J. EISENBERG (1983)
Synthesis and processing of glycoprotein D of herpes simplex virus types 1 and 2 in an in vitro system.
J. Virol. 48, 521 - 533

MORGAN, C., H. M. ROSE u. B. MEDNIS (1968)

Electron microscopy of the herpes simplex virus. I. Entry.

J. Virol. 2, 507 - 516

MORSE, L. S., T. G. BUCHMAN, B. ROIZMAN u. P. A. SCHAFFER (1977)

Anatomy of herpes simplex virus DNA. IX. Apparent exclusion of some parental DNA arrangements in the generation of intertypic (HSV-1 x HSV-2) recombinants.

J. Virol. 24, 231 - 248

MORSE, L. S., L. PEREIRA, B. ROIZMAN u. P. A. SCHAFFER (1978)

Anatomy of herpes simplex virus (HSV) DNA. X. Mapping of viral genes by analysis of polypeptides and functions specified by HSV-1 x HSV-2 recombinants.

J. Virol. 26, 389 - 410

NOBLE, A. G., G. T.-Y. LEE u. P. G. SPEAR (1983)

Anti-gD monoclonal antibodies inhibit cell fusion induced by herpes simplex virus type 1.

Virology 129, 218 - 224

NORRILD, B. (1980)

Immunochemistry of herpes simplex virus glycoproteins.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 90, 67 - 106

NORRILD, B. (1985)

Humoral response to herpes simplex virus infections.

in: B. ROIZMAN (Hrsg.): The Herpesviruses. Bd. 3.

Plenum Press, New York und London, S. 69-86

NORRILD, B., O. J. BJERRUM, H. LUDWIG u. B. F. VESTERGAARD (1978 a)

Analysis of herpes simplex virus type 1 antigens exposed on the surface of infected tissue culture cells.

Virology 87, 307 - 317

NORRILD, B., H. LUDWIG u. R. ROTT (1978 b)

Identification of a common antigen of herpes simplex virus, bovine herpes mammillitis virus and B virus

J. Virol. 26, 712 - 717

OAKLEY, B. R., D. R. KIRSCH u. N. R. MORRIS (1980)

A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels.

Anal. Biochem. 105, 361 - 363

OLOFSON, S., J. BLOMBERG u. E. LYCKE (1981)

O-glycosidic carbohydrate-peptide linkages of herpes simplex virus glycoproteins.

Arch. Virol. 70, 321 - 329

OLOFSON, S., I. SJÖBLOM, M. LUNDSTRÖM, S. JEANSSON u. E. LYCKE (1983)

Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1: Characterization of O-linked oligosaccharides.

J. gen. Virol. 64, 2735 - 2747

O'SHANNESSY, D. J., M. J. DOBERSON, R. H. QUARLES (1984)

A novel procedure for labeling immunoglobulins by conjugation to oligosaccharide moieties.

Immunol. Lett. 8, 273 - 277

PAULI, G. u. H. LUDWIG (1977)

Immunoprecipitation of herpes simplex virus type 1 antigens with different antisera and human cerebrospinal fluids.

Arch. Virol. 53, 139 - 155

PAULI, G., J.-P. GREGERSEN, u. H. LUDWIG (1984)

Plaque/focus immunoassay: a simple method for detecting antiviral monoclonal or other antibodies and viral antigens in cells.

J. Immunol. Methods 74, 337 - 344

PAULI, G., B. NORRILD u. H. LUDWIG (1979)

Expression of common antigenic determinants of HSV-1 and BHM infected cells.

4th Cold Spring Harbor Meeting on Herpesviruses, Cold Spring Harbor, New York, 1979. Kongr.Ber., S. 68

PARA, M. F., M. L. PARISH, A. G. NOBLE u. P. G. SPEAR (1985)

Potent neutralizing activity associated with anti-glycoprotein D specificity among monoclonal antibodies selected for binding to herpes simplex virus.

J. Virol. 55, 483 - 488

PELLETT, P. E., K. G. KOUSOULAS, L. PEREIRA u. B. ROIZMAN (1985)

The anatomy of the herpes simplex virus 1 strain F glycoprotein gB gene: primary sequence and predicted protein structure of the wild type and of monoclonal antibody-resistant mutants.

J. Virol. 53, 243 - 253

PEREIRA, L. u. R. COURTNEY (1975)

Polypeptides synthesized in herpes simplex virus type 2 infected HEp-2 cells.

Virology 66, 217 - 228

PEREIRA, L. D. DONDERO u. B. ROIZMAN (1982)

Herpes simplex virus glycoprotein gA/B: evidence that infected Vero cells products comap and arise by proteolysis.

J. Virol. 44, 88 - 97

PEREIRA, L., T. KLASSEN u. J. R. BARINGER (1980)

Type-common and type-specific monoclonal antibodies to herpes simplex virus type 1.

Infect. Immun. 29, 724 - 732

PEREIRA, L., D. DONDERO, B. NORRILD u. B. ROIZMAN (1981)

Differential immunologic reactivity and processing of glycoproteins gA and gB of herpes simplex virus types 1 and 2 made in Vero and HEp-2 cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5202 - 5206

PEREIRA, L., E. CASSAI, R. W. HONESS, B. ROIZMAN, M. TERNI u. A. NAHMIAS (1976)

Variability in the structural polypeptides of herpes simplex virus 1 strains: Potential application in molecular epidemiology.

Infect. Immun. 13, 211 - 220

PIZER, L. I., G. H. COHEN u. R. J. EISENBERG (1980)

Effect of tunicamycin on herpes simplex virus glycoproteins and infectious virus production.

J. Virol. 34, 142 - 153

PURIFOY, D. J. M. u. K. L. POWELL (1975)

DNA-binding proteins induced by herpes simplex virus type 1.

J. gen. Virol. 29, 167 - 178

PRESTON, V. G., A. J. DAVISON, H. S. MARSDEN, M. C. TIMBURY, J. H. SUBAK-SHARPE J. H. u. N. M. WILKIE (1978)

Recombinants between herpes simplex virus type 1 and 2: analyses of genome structures and expression of immediate early polypeptides

J. Virol. 28, 499 - 517

RECTOR, J. T., R. N. LAUSCH u. J. E. OAKES (1982)

Use of monoclonal antibodies for analysis of antibody-dependent immunity to ocular herpes simplex virus type 1 infection.

Infect. Immun. 38, 168 - 174

ROIZMAN, B. u. W. BATTERSON (1985)

Herpesviruses and their replication.

in: B. N. FIELDS, D. M. KNIPE, R M. CHANOCK, J. L. MELNICK, B. ROIZMAN u. R. E. SHOPE (Hrsg.): Virology.

Raven Press, New York, S. 497 - 526

ROIZMAN, B. u. D. FURLONG (1974)

The replication of herpesviruses.

in. H. FRAENKEL-CONRAT u. R. R WAGNER (Hrsg.): Comprehensive Virology. Bd. 3.

Plenum Press, New York, S. 229 - 403

ROIZMAN, B., P. G. SPEAR u. E. D. KIEFF (1973)

Herpes simplex virus I and II: A biochemical definition.

in: Persistent Virus Infections. Perspectives in Virology. Bd. VIII. Academic Press, New York, London, S. 129 - 166

ROSE, J. K. u. C. J. GALLIONE (1981)

Nucleotide sequences of the mRNAs encoding the vesicular stomatitis G and M proteins determined from cDNA clones containing the complete coding regions.

J. Virol. 39, 519 - 528

ROSE, J. K., W. J. WELCH, B. M. SEFTON, F. S. ESCH u. N. C. LING (1980)

Vesicular stomatitis glycoprotein is anchored in the viral membrane by a hydrophobic domain near the COOH-terminus.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3884 - 3888

ROTHMAN, J. E.

The compartmental organization of the Golgi apparatus.

Sci. Am. 253, 84 - 95

RUYECHAN, W. T., L. S. MORSE, D. M. KNIPE u. B. ROIZMAN (1979)

Molecular genetics of herpes simplex virus. II. Mapping of the major viral glycoproteins and of the genetic loci specifying the social behavior of infected cells.

J. Virol. 29, 677 - 697

RWEYEMAMU, M. M., R. H. JOHNSON u. J. B. TUTT (1966)

Some observations on herpes virus mammilitis of bovine animals.

Vet. Rec. 79, 810 - 811

SABIN, A. B. (1934)

Studies on the B virus I: The immunological identity of a virus isolated from a human case of ascending myelitis associated with visceral necrosis.

Br. J. exp. Pathol. 15, 268 - 372

SARMIENTO, M., M. HAFFEY u. P. G. SPEAR (1979)

Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. III. Role of glycoproteins VP7 (B_2) in virion infectivity.

J. Virol. 29, 1149 - 1158

SCHNEWEIS, K. E. (1962)

Die serologischen Beziehungen der Typen 1 und 2 von *Herpesvirus hominis* zu *Herpesvirus simiae*.

Z. Immunitätsforsch. 124, 335 - 341

SCHNEWEIS, K. E. (1967)

Herpes simplex virus in various disease entities.

Dtsch. med. Wochenschr. 92, 2313 - 2314

SCHNEWEIS, K. E. u. H. BRANDIS (1961)

Typendifferenzierung bei Herpes Simplex Virus.

Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig. A med. Mikrobiol Infektionskr. Parasitol. 183, 556 - 558

SCHNEWEIS, K. E. u. A. J. NAHMIAS (1971)

Antigens of herpes simplex virus type 1 and 2 -immunodiffusion and inhibition of passive haemagglutination studies

Z. Immunitätsforsch. 141, 471 - 478

SERAFINI-CESSI, F., F. DALL'OLIO, M. SCANNAVINI u. G. CAMPADELLI-FIUME (1983)

Processing of herpes simplex virus type 1 glycans in cells defective in glycosyltransferases of the Golgi system: relationship to cell fusion and virion egress.

Virology 131, 59 - 70

SHARMA, J. M., D. BURGER u. S. G. KENZY (1972)

Serological relationships among herpesviruses cross-reacting between Marek's disease virus and pseudorabiesvirus as detected by immunofluorescence.

Infect. Immun. 5, 406 - 411

SHOWALTER, S. D., M. ZWEIG u. B. HAMPAR (1981)

Monoclonal antibodies to herpes simplex virus type 1 proteins, including immediate-early protein ICP 4.

Infect. Immun. 34, 684 - 692

SNOWDEN, B. W. u. I. W. HALLIBURTON (1985)

Identification of cross-reacting glycoproteins of 4 herpesviruses by Western blotting monoclonal antibodies, monomeric and oligomeric polypeptides.

J. gen. Virol. 66, 2039 - 2044

SNOWDEN, B. W., P. R KINCHINGTON, K. L. POWELL u. I. W. HALLIBURTON (1985)

Antigenic and biochemical analysis of gB of herpes simplex virus type 1 and type 2 and of cross-reacting glycoproteins induced by bovine mammilitis virus and equine herpesvirus type 1.

J. gen. Virol. 66, 231 - 247

SPEAR, P.G. (1976)

Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. I. Identification of four glycoprotein precursors and their products in type 1-infected cells.

J. Virol 17, 991 - 1008

SPEAR, P.G. (1980)

Composition and organization of herpesvirus virions and properties of some of the structural proteins.

in: F. RAPP (Hrsg.): Oncogenic Herpesviruses. Bd. 1.

CRC Press, Boca Raton, S. 53 - 84

SPEAR, P.G. (1985)

Glycoproteins specified by herpes simplex viruses.

in: B. ROIZMAN (Hrsg.): The Herpesviruses. Vol. 3.

Plenum Press, New York, London, S. 315 - 356

SPEAR, P. G. u. B. ROIZMAN (1972)

Proteins specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural properties of the herpesvirion.

J. Virol. 9, 143 - 159

SPEAR, P. G., M. SARMIENTO u. R. MANSERVIGI (1978)

The structural proteins and glycoproteins of herpesviruses: a review.

in: G. DE-THE, W. HENLE u. F. RAPP (Hrsg.). Oncogenesis and herpesviruses. Bd. III/1.

IARC Sci. Publ. Nr. 24, Lyon 1978, S. 157 - 167

STERZ, H. (1973)

Biologische und physikalische Eigenschaften des Virus der bovinen Herpes Mammillitis.

Gießen, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss.

STERZ, H. u. H. LUDWIG (1972)

Plaque test and biological properties of bovine herpes mammillitis (BHM) virus.

Zentralbl. Veterinärmed. Reihe B 19, 473 - 478

STERZ, H., H. LUDWIG u. R. ROTT (1973-74)

Immunologic and genetic relationship between herpes simplex virus and bovine herpes mammilitis virus.

Intervirology 2, 1 - 13

UCHIDA, S., S. WATANABE u. M. KATO (1966)

Incomplete growth of simian virus 40 in African green monkey kidney culture, induced by serial undiluted passages.

Virology 28, 135 - 141

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., J. VAN DEN HURK, J. E. GILCHRIST, V. MISRA u. L. BABIUK (1984)

Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoproteins: characterization of their biochemical and immunological properties.

Virology 135, 466 - 479

WATSON, D. H., P. WILDY, B. A. M. HARVEY u. W. H. I. SHEDDEN (1967)

Serological relationship among viruses of the herpes group.

J. gen. Virol. 1, 139 - 141

WATSON, R. J., J. H. WEIS, J. S. SALSTROM u. L. W. ENQUIST (1982)

Herpes simplex virus type 1 glycoprotein D gene: nucleotide sequence and expression in Escherichia coli.

Science 218, 381 - 384

WENSKE, E. A. u. R. J. COURTNEY (1983)

Glycosylation of herpes simplex virus type 1 gC in the presence of tunicamycin.

J. Virol. 46, 297 - 301

WENSKE, E. A., M. W. BRATON u. R. J. COURTNEY (1982)

Endo-ß-*N*-acetylglucosaminidase H sensitivity of precursors to herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB and gC.

J. Virol. 44, 241 - 248

WILDY, P. u. D. H. WATSON (1963)

Electrone microscopic studies on the architecture of animal viruses.

Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 27, 25 - 47

WILDY, P., W. C. RUSSELL u. R. W. HORNE (1960)

The morphology of herpesvirus.

Virology 12, 204 - 222

YEO, J., R. A. KILLINGTON, D. H. WATSON u. K. L. POWELL (1980)

Studies on cross-reactive antigens in the herpesviruses.

Virology 108, 256 - 266

ZEZULAK, K. M. u. P. G. SPEAR (1983)

Characterization of a herpes simplex virus type 2 75,000-molecular-weight glycoprotein antigenically related to herpes simplex virus type 1 glycoprotein C.

J. Virol. 47, 553 - 562

ZWEIG, M., S. D. SHOWALTER, S. V. BLADEN, C. J. HEILMAN Jr. u. B. HAMPAR (1983)

Herpes simplex virus type 2 glycoprotein gF and type 1 glycoprotein gC have related antigenic determinant.

J. Virol. 47, 185 - 192

Herrn Professor Dr. Hanns Ludwig danke ich herzlich für die Überlassung des Rahmenthemas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie die anregenden Diskussionen und die Förderung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Georg Pauli für die Hilfe bei der Ausarbeitung des Themas, die Anleitung und Unterstützung beim Etablieren von Techniken und seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Die Bereitstellung monoklonaler Antikörper gegen BHV-2 durch Herrn Professor Pauli und gegen HSV durch Frau Professor Pereira und Herrn Professor Roizman war eine große Hilfe bei der Bearbeitung der Problematik.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Virologie der Freien Universität Berlin danke ich herzlich für ihre Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit. Mein Dank gilt auch den Wissenschaftlern und Technikern des Robert-Koch-Instituts für ihre Hilfestellungen, ganz besonders Frau Silvia Pietschmann und Herrn Dr. Hans Gelderblom.

Ein Teil meiner Arbeiten wurde aus Mitteln des Bundesministers für Forschung und Technologie (PTB 8352/BCT 31 LA, H.L.) gefördert.

Einige der in meiner Dissertation vorgelegten Ergebnisse wurden bereits an anderer Stelle publiziert oder sind zur Veröffentlichung eingereicht:

CONRATHS, F., G. PAULI, H. LUDWIG u. J. E. Lewis (1985)
Monoclonal antibodies against bovine herpesmammillitis virus (BHV-2) and their cross-reactivity with HSV-1 and -2.
in: P.-P. PASTORET, E. THUY u. J. SALIKI (Hrsg.): Immunity to herpesvirus infections of domestic animals.
Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, S. 107 - 112

CONRATHS, F., G. PAULI, H. LUDWIG, M. ACKERMANN, L. PEREIRA u. B. ROIZMAN
Glycoprotein gB of HSV and BHV-2: conserved epitopes, their expression and function.
in: 10th International Herpesvirus Workshop, Ann Arbor, 1985. (Abstract), S. 138

CONRATHS, F., G. PAULI u. H. LUDWIG
Biology and function of bovine herpesvirus type 2 specific monoclonal antibodies and their cross-reactivity with herpes simplex virus.
J. Virol. (zur Veröffentlichung eingereicht)

CONRATHS, F., M. ACKERMANN, H. LUDWIG, G. PAULI, L. PEREIRA u. B. ROIZMAN
Conserved epitopes on glycoprotein gB of herpes simplex virus and bovine herpes virus type 2.
J. Virol. (zur Veröffentlichung eingereicht)

Lebenslauf

Franz Josef Conraths, geboren am 25. Juli 1956 in Wevelinghoven, jetzt Grevenbroich

Anschrift:	Am Vierstückenpfuhl 6 1000 Berlin 37
Eltern:	Dr. med. vet. Franz Conraths und seine Ehefrau Marianne Conraths, geb. Schoenen
1963 - 1967	Besuch der katholischen Volksschule St. Martinus in Wevelinghoven
1967 - 1976	Besuch des Kreisgymnasiums Grevenbroich
1976	Allgemeine Hochschulreife
1976 - 1977	Grundwehrdienst
April 1978	Beginn des Studiums der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
April 1980	Tierärztliche Vorprüfung
Mai 1982	Eheschließung mit Kornelia Diekers
15. 06. 1983	Abschluß der Tierärztlichen Prüfung
21. 07. 1983	Approbation als Tierarzt
September 1983	Beginn der Arbeit an der vorliegenden Dissertation
Juni 1984	Aufnahme einer Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virologie der Freien Universität Berlin

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen

Berlin 1986